



**GIULIANA VIEGAS SCHIRATO**

**CARACTERIZAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA  
DE NEOPLASMAS MAMÁRIOS ESPONTÂNEOS DE GATAS  
(*Felis catus*)**

**RECIFE**

**2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**GIULIANA VIEGAS SCHIRATO**

**CARACTERIZAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA**  
**DE NEOPLASMAS MAMÁRIOS ESPONTÂNEOS DE GATAS**

*(Felis catus)*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Veterinária.

Orientadora:

Profa Dra Ana Lúcia Figueiredo Porto

Co-orientador:

Prof Dr Mário Ribeiro de Melo Júnior

**RECIFE**

**2011**

Ficha catalográfica

S337c Schirato, Giuliana Viegas  
Caracterização histopatológica e imunoistoquímica de  
neoplasmas mamários espontâneos de gatas (*Felis catus*) /  
Giuliana Viegas Schirato. – 2011.  
112 f.: il.

Orientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto.  
Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade  
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina  
Veterinária, Recife, 2011.  
Inclui referências e anexo.

1. *Felis catus* 2. Neoplasias mamárias 3. PCNA 4. Bcl - 2  
5. Ki - 67 6. Imunoistoquímica I. Porto, Ana Lúcia Figueiredo,  
orientadora II. Título

CDD 636.708926

*Dedico à Maria Valdez Viegas, minha mãe, pela força, incentivo, paciência e amor por mim durante todas as etapas de minha vida.*

*A Massahiro Ishii, meu noivo, pelo amor, compreensão e companheirismo em mais essa etapa.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por minha saúde, família e amigos.

A coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinária da UFRPE e aos secretários Tom Menezes e Edna Chérias pela dedicação e competência.

À minha orientadora Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto, por ter me dado a oportunidade de trabalhar neste projeto; dispensando-me apoio e incentivo.

Ao meu orientador Dr. Mário Ribeiro de Melo Júnior, meu agradecimento especial, por ter norteado a elaboração e execução desse trabalho, sempre me prestando enorme apoio, respeito, paciência em todos os momentos que precisei de ajuda.

Ao Dr. Vandilson Rodrigues, pelo fornecimento de amostras de tecido neoplásico mamário de gatas.

Ao Dr. Rodrigo Calda Menezes, pelo fornecimento de amostras de tecido mamário de gatas.

À Dra. Catarina Neves pela colaboração nas análises histopatológicas e por todas as sugestões para esse trabalho durante o meu exame de qualificação.

À Edlene Lima Ribeiro, Dra. Christina Peixoto e Gustavo Andrey Lins Falcão de Alcântara pela colaboração no processamento histopatológico das amostras.

À Sra. Vera Lúcia Farias Cavalcanti, pela colaboração técnica e apoio.

Ao meu grande amigo Flávio Oliveira Silva, pela sua amizade e seu apoio constante em minha vida.

Aos meus grandes amigos e colegas de trabalho: Laurimar Thomé da Rocha, Rodrigo Cirilo de Oliveira, Ailton da Silva Pinto, Eduardo Farias da Costa e Gerlane Tavares de Souza Chioratto pela amizade, companheirismo e solidariedade.

A todos que colaboraram de forma direta ou indiretamente na concretização deste trabalho, com certeza, sem a ajuda de todos vocês não seria possível realizá-lo.

Meus sinceros agradecimentos.

*“É melhor tentar e falhar, que se preocupar e ver a vida passar; é melhor tentar, ainda que em vão, que se sentar fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder. Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver ...”*

Martin Luther King

## SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	VII
RESUMO .....	VIII
ABSTRACT .....	IX
LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	X
LISTA DE TABELAS .....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS.....	XIV
1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. JUSTIFICATIVA .....	19
1.2. OBJETIVOS GERAIS .....	19
1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	21
2.1. NEOPLASIAS EM ANIMAIS DOMÉSTICOS .....	21
2.2. NEOPLASIAS MAMÁRIAS EM FELINOS .....	29
2.3. DIAGNÓSTICO, ESTADIAMENTO TUMORAL E PROGNÓSTICO DE NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE FELINOS .....	38
3. REFERÊNCIAS .....	46
4. ARTIGOS.....	58
4.1. Caracterização histopatológica de tumores mamários espontâneos de gatas ( <i>Felis catus</i> ).....	58
4.2. Perfil histoquímico e antigênico de neoplasmas mamários em felinos.....	78
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	102
5.1. PERSPECTIVAS .....	102
ANEXOS.....	104

## RESUMO

### CARACTERIZAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA DE NEOPLASMAS MAMÁRIOS ESPONTÂNEOS DE GATAS (*Felis catus*)

Com exceção dos tumores de pele e do tecido linfo-hematopoiético, o neoplasmas mamários são os mais comuns em felinos domésticos. Os carcinomas mamários de gatas possuem prognóstico desfavorável, uma vez que tais tumores são bastante agressivos e com grande capacidade de gerar metástases. Objetivou-se com esse estudo, caracterizar sob o ponto de vista histopatológico, histoquímico e imunoistoquímico; neoplasias mamárias de ocorrência espontânea em gatas. Trinta e cinco amostras de tecido neoplásico foram coletadas cirurgicamente e os cortes histológicos foram corados pela Hematoxilina-Eosina (HE), para estudo histopatológico. Para análise histoquímica, utilizou-se o Tricromico de Masson e Ácido Periódico de Schiff (PAS), para avaliar os depósitos de colágeno e glicosaminoglicanos associados aos tumores, respectivamente. Para realização dos ensaios imunoistoquímicos foram utilizados os anticorpos anti-Ki-67, anti-PCNA e anti-Bcl-2. Nos resultados obtidos observou-se que 14,29% das lesões foram classificadas como benignas (fibroadenoma, adenoma simples e adenose) e 85,71% como adenocarcinomas. As neoplasias malignas eram multifocais, de padrão de crescimento predominantemente invasivo, com presença de necrose, figuras de mitose, e infiltrado inflamatório. As análises histoquímicas revelaram que as lesões malignas apresentavam padrão de coloração moderada a forte quando coradas com PAS e fraca a moderada com Tricrômico de Masson. A marcação anti-Ki-67 apresentou padrão citoplasmático e nuclear em células malignas bem diferenciadas no tecido neoplásico. A proteína Bcl-2 apresentou padrão membranar restrito ao tecido transformado e o tecido marcado com o anticorpo anti-PCNA, demonstrou padrão citoplasmático e nuclear em células glandulares, ocasionalmente em células estromais de aspecto epitelióide. Em resumo, a grande quantidade de figuras de mitose e a maior reatividade à marcação com o anticorpo anti-PCNA sugere neoplasmas com intensa atividade proliferativa evidenciando um mau prognóstico para os indivíduos portadores.

**Palavras-chave:** *Felis catus*, neoplasias mamárias, imunoistoquímica, PCNA, Ki-67, Bcl-2.



## ABSTRACT

### HISTOPATHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF SPONTANEOUS MAMMARY NEOPLASMS OF CATS (*Felis catus*)

After skin tumors and lymphohematopoietic tissue, mammary neoplasms are most common in domestic cats. Mammary carcinomas of cats have poor prognosis, since such tumors are very aggressive and with great ability to generate metastases. The aim of this study was to characterize the point of view histopathological, histochemical and immunohistochemical, spontaneously occurring mammary tumors in cats. Thirty-five samples of tumor tissue were collected surgically and histological sections were stained with hematoxylin-eosin (HE) for histopathological analysis. For histochemical analysis, were used the Masson's Trichrome and Periodic Acid Schiff (PAS) to evaluate the deposition of collagen and glycosaminoglycans associated with tumors, respectively. To perform the immunohistochemistry assays were used anti-Ki-67, anti-PCNA and anti-Bcl-2. The obtained results showed that 14.29% of the lesions were classified as benign (fibroadenoma, adenoma and simple adenosis) and 85.71% as adenocarcinomas. Malignant neoplasms were multifocal, predominantly of invasive growth pattern, presence of necrosis, mitotic figures, and inflammatory infiltrate. The histochemical analysis revealed that the malignant lesions exhibited moderate to strong staining pattern when stained with PAS and weak to moderate with MT. Marking anti-Ki-67 showed cytoplasmic and nuclear pattern in well-differentiated malignant cells in tumor tissue. The protein Bcl-2 showed membrane pattern restricted to the processed tissue and the tissue marked with anti-PCNA showed nuclear and cytoplasmic pattern in glandular cells, occasionally in stromal cells of epithelioid appearance. In summary, the large number of mitotic figures and increased reactivity to staining with anti-PCNA antibody suggests neoplasms with intense proliferative activity indicating a poor prognosis for affected individuals.

**Key words:** *Felis catus*, mammary neoplasms, immunohistochemistry, PCNA, Ki-67, Bcl-2.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	<b>Pág.</b>
<p><b>Figura 01:</b> Processo esquemático de metástase tumoral, iniciado por: a) Tumor <i>In situ</i> aderido a uma membrana intacta; b) A invasão necessita mudanças na interação célula-célula e célula-matriz extracelular, destruição de proteínas da matriz e estroma. Células tumorais metastáticas podem c) disseminar-se por via linfática, ou d) diretamente na circulação. e) Sobrevivência e ancoragem das células tumorais. f) Colonização de células metastáticas em locais distantes ao tumor satélite através de focos celulares, podendo ficar dormentes durante longos períodos de tempo, ocultando micrometástases. g) Metástase em crescimento progressivo e angiogênese. Fonte: STEEG (2003).....</p>	<b>27</b>
<p><b>Figura 02:</b> Classificação histológica de tumores mamários na espécie felina, definida pela OMS (MISDORP et al., 1999).....</p>	<b>34</b>
<p><b>Figura 03:</b> Aspecto macroscópico do carcinoma mamário de felinos (GIMÉNEZ et al., 2010).....</p>	<b>35</b>
<p><b>Figura 04:</b> Apresentação histopatológica dos tipos tumorais dos neoplasmas mamários espontâneas de gatas (<i>Felis catus</i>) oriundas da casuística do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (HV, DMV, UFRPE) no período de 2008 a 2010. Hematoxilina-Eosina (HE). A (100X) Carcinoma sólido apresentando extensa área de necrose e atipia celular; B (100X) Carcinoma túbulo-papilar; C (100X) Carcinoma mucinoso; D (100X) Fibroadenoma mamário. * - áreas de necrose; → - apresentação papilar; m - depósito de muco (glicosaminoglicanos); f - tecido fibroso.....</p>	<b>73</b>
<p><b>Figura 05:</b> Número médio de figuras de mitose encontradas em lesões mamárias benignas e carcinomas mamários de gatas (<i>Felis catus</i>) oriundas da casuística do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (HV, DMV, UFRPE) no período de 2008 a 2010. *<i>P</i> = 0,006.....</p>	<b>74</b>
<p><b>Figura 06:</b> Presença de figuras de mitose em carcinomas mamários de gatas (<i>Felis catus</i>) em diversas fases do ciclo celular. Hematoxilina de Harris. A (400X) Metáfase; B (400X) Prófase; C (400X) Interfase; D (400X) Telófase. → - figura de mitose.....</p>	<b>75</b>

- Figura 07:** Distribuição do grau histológico dos carcinomas mamários de gatas (*Felis catus*) oriundas da casuística do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (HV, DMV, UFRPE) no período de 2008 a 2010..... **76**
- Figura 08:** Distribuição do grau citológico dos carcinomas mamários de gatas (*Felis catus*) oriundas da casuística do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (HV, DMV, UFRPE) no período de 2008 a 2010..... **77**
- Figura 09:** Marcação histoquímica dos tecidos neoplásicos mamários de gatas (*Felis catus*) com o Ácido Periódico de Schiff (PAS). **A** (100X) Carcinoma mucinoso apresentando padrão coloração intensa (+++); **B** (100X) Carcinoma ductal apresentando padrão de coloração moderada (++); **C** (100X) Fibroadenoma mamário apresentando padrão coloração moderada (++); **D** (100X) Tecido mamário normal de gatas, onde não foram evidenciadas células PAS+. \* - Evidência da coloração nos tecidos..... **98**
- Figura 10:** Marcação histoquímica dos tecidos neoplásicos mamários de gatas (*Felis catus*) com Tricrômico de Masson (TM). **A** (100X) Fibroadenoma mamário apresentando padrão coloração intensa (+++); **B** (100X) Carcinoma mucinoso apresentando padrão de coloração moderada (++); **C** (100X) Carcinoma ductal apresentando padrão coloração fraca (+); **D** (100X) Carcinoma papilar, onde não foram evidenciadas quantidades significativas de colágeno intestinal. \* - Evidência da coloração nos tecidos..... **99**
- Figura 11:** Marcação imunoistoquímica dos tecidos neoplásicos mamários de gatas (*Felis catus*) com anticorpos PCNA, Ki-67 e Bcl-2. **A** (100X) Fibroadenoma apresentando marcação positiva para PCNA (padrão de marcação citoplasmático e nuclear); **B** (100X) Carcinoma sólido apresentando intensa marcação do PCNA (padrão de marcação citoplasmático e nuclear); **C** (100X) Fibroadenoma mamário apresentando negatividade ao Ki-67; **D** (100X) Carcinoma mamário apresentando positividade à marcação do Ki-67 (padrão de marcação citoplasmático e nuclear); **E** (100X) Fibroadenoma mamário apresentando negatividade ao Bcl-2; **F** (100X) Carcinoma mamário apresentando positividade à marcação do Bcl-2 (padrão de marcação membranar restrito ao tecido transformado). → evidência da marcação imunoistoquímica..... **100**

## LISTA DE TABELAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabela 01:</b> Nomenclatura de tumores comumente encontrados nos animais. (BARBARA, POWERS e DERNEL. 1998; KUMAR, ABBAS e FAUSTO, 2005).....	<b>24</b>
<b>Tabela 02:</b> Critérios de distinção de tumores benignos e malignos (LOURO et al., 2002).....	<b>25</b>
<b>Tabela 03:</b> Comparação entre os fatores de risco para carcinoma da glândula mamária de cães, gatos e mulheres (MULAS e REYMUNDO, 2000).....	<b>32</b>
<b>Tabela 04:</b> Classificação clínica TNM de tumores mamários de felinos (OWEN, 1980).....	<b>39</b>
<b>Tabela 05:</b> Estadiamento clínico de tumores mamários de felinos baseado na classificação TNM (GIMÉNEZ et al., 2010).....	<b>40</b>
<b>Tabela 06:</b> Gradação histológica de tumores mamários de felinos (GIMÉNEZ et al., 2010).....	<b>40</b>
<b>Tabela 07:</b> Distribuição das lesões mamárias espontâneas de gatas ( <i>Felis catus</i> ) oriundas da casuística do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (HV, DMV, UFRPE) no período de 2008 a 2010.....	<b>71</b>
<b>Tabela 08:</b> Distribuição dos parâmetros histopatológicos das lesões mamárias espontâneas de gatas ( <i>Felis catus</i> ) oriundas da casuística do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (HV, DMV, UFRPE) no período de 2008 a 2010.....	<b>72</b>

- Tabela 09:** Número de figuras de mitose por campo (400X) e perfil de marcação imunoistoquímica para os marcadores PCNA, Ki-67 e Bcl-2 de lesões mamárias de gatas (*Felis catus*) oriundas da casuística do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (HV, DMV, UFRPE) no período de 2008 a 2010..... **95**
- Tabela 10:** Perfil histoquímico das lesões mamárias de gatas (*Felis catus*) oriundas da casuística do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (HV, DMV, UFRPE) no período de 2008 a 2010, utilizando a coloração Ácido Período de Schiff (PAS) e Tricrômico de Masson (para identificação de colágeno intersticial)..... **96**
- Tabela 11:** Perfil imunoistoquímico com marcação dos anticorpos anti-PCNA, anti-Ki-67 e anti-Bcl-2 em lesões mamárias de gatas (*Felis catus*) oriundas da casuística do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (HV, DMV, UFRPE) no período de 2008 a 2010..... **97**

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

1. % - Percentual
2. °C – Graus Celsius
3.  $\mu\text{m}$  – Micrômetro
4. *bax* – Proto-oncogene *bax*
5. **Bcl-2** – Proto-oncogene Bcl-2
6. **BSA** – Albumina sérica bovina
7. **CAM** – Citoqueratina de baixo peso molecular
8. **c-erb B2** – Proto-oncogene c-erb B2
9. **cm** – Centímetro
10. **COX** – Enzima ciclooxigenase
11. **COX-1** – Enzima ciclooxigenase-1
12. **COX-2** – Enzima ciclooxigenase-2
13. **DAB** – Diaminobenzidina
14. **DMV** – Departamento de Medicina Veterinária
15. **DNA** – Ácido desoxirribonucléico
16. **dp** – Desvio padrão
17. **ER** – Receptor de estrogênio
18. **GH** – Hormônio do crescimento
19. **HE** – Coloração Hematoxilina-Eosina
20. **HER-2** – Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano
21. **HV** – Hospital Veterinário
22. **IQ** – Técnica imunoistoquímica
23. **Ki-67** – Proteína Ki-67
24. **M** – Média
25. **MEC** – Matriz extracelular
26. **mm** – Milímetro
27. **MMP** – Metaloproteinase de matriz
28. **n** – Amostra
29. **OMS** – Organização Mundial da Saúde
30. **OSH** – Ovariosalpingo-histerectomia
31. **P.A.** – Pureza analítica
32. **PAS** – Ácido periódico de Schiff

- 33. **PBS** – Tampão fosfato salino
- 34. **PCNA** – Antígeno de proliferação celular
- 35. **pH** – Potencial hidrogeniônico
- 36. **PR** – Receptor de progesterona
- 37. **RNA** – Ácido ribonucléico
- 38. **TM** – Coloração Tricrômico de Masson
- 39. **TMN** – Sistema de classificação de estadiamento tumoral (onde, **T** representa a extensão do tumor primário; **N** descreve a condição dos linfonodos regionais e **M** designa a presença ou ausência de metástases)
- 40. **UFRPE** – Universidade Federal Rural de Pernambuco
- 41. **VEGF** – Fator de crescimento vascular endotelial

# ***Introdução***



## 1. INTRODUÇÃO

A ocorrência de tumores mamários de gatas (*Felis catus*) representa a terceira causa de patologias oncológicas nessa espécie, seguida apenas de neoplasias de pele e as de origem linfo-hematopoiética (GIMÉNEZ et al., 2010). Os carcinomas são as neoplasias mais comuns, representando 80-90% dos casos. Tais tumores são malignos e bastante agressivos, com alta capacidade de metástase e apresentam prognóstico ruim – sendo uma importante causa de mortalidade, principalmente em animais de meia-idade e idosos (AMORIM et al., 2006; SEIXAS et al., 2007).

Os carcinomas mamários de gatas possuem diversos padrões histológicos, ou uma mistura deles em um mesmo tumor (SEIXAS et al., 2007). Tais tumores são compostos por células epiteliais luminais e a ocorrência de carcinomas complexos é rara (MISDORP et al., 1999; SEIXAS et al., 2008). Macroscopicamente possuem consistência firme e nodular, sendo únicos ou múltiplos e as glândulas caudais dos animais são as mais acometidas. Pelo menos 25% das gatas afetadas possuem neoplasias ulcerativas (MAGALHÃES et al., 2009).

A maioria dos tumores mamários de felinos é classificada como carcinomas simples, sendo que as apresentações histopatológicas mais frequentes são carcinomas túbulo-papilares, sólidos e cribriformes. Sarcomas, carcinomas de células escamosas e carcinomas mucinosos são menos comuns (MILLANTA et al., 2002; MAGALHÃES et al., 2009). Em função da característica de alta malignidade, o diagnóstico da patologia deve ser realizado precocemente e de maneira precisa para que se inicie a terapia antitumoral o mais rápido possível, uma vez que tais condições influenciam diretamente no tempo de sobrevida do paciente (GIMÉNEZ et al., 2010).

O diagnóstico presuntivo do tumor mamário deve ser feito no exame de clínico, palpação na maioria dos casos. Entretanto, dever ser tomado o cuidado para diferenciar hipertrofia mamária e mastite (MORRIS e DOBSON, 2007). O diagnóstico definitivo deverá ser realizado através do exame histopatológico de amostras obtidas por biópsia excisional (NELSON e COUTO, 2001).

Existem atualmente diversas técnicas diagnósticas que auxiliam no tratamento das neoplasias, dentre elas pode-se destacar a imunoistoquímica (IQ) de biópsias teciduais, método este de grande auxílio na discriminação de tumores assemelhados e, muitas vezes, de difícil interpretação pelos métodos histológicos de rotina (NOVELLINO, AMORIM e QUEIROZ, 2003).

O estudo imunoistoquímico tem sido utilizado em diferentes situações da patologia mamária, sendo as mais importantes: avaliação de fatores preditivos e prognósticos do câncer de mama, pesquisa de células epiteliais metastáticas em linfonodo sentinela, diagnóstico diferencial de lesões mamárias e determinação de possível origem de neoplasias metastáticas (SALLES et al., 2009).

A imunoistoquímica teve grande desenvolvimento a partir da década de 1970, quando foi possível demonstrar antígenos teciduais pela técnica de imunoperoxidase em tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina. Atualmente, a IQ está incorporada à patologia cirúrgica como método diagnóstico complementar. O desenvolvimento de anticorpos monoclonais gerou enorme fonte de reagentes altamente específicos para a demonstração de vários antígenos teciduais e celulares, e o advento da recuperação antigênica foi um fato marcante na evolução da técnica (WERNER et al., 2005).

O índice de proliferação, determinada por marcadores do ciclo celular, tais como o Ki-67 e o antígeno celular de proliferação nuclear (PCNA), tem valor prognóstico para carcinomas mamários de felinos (PEÑA et al., 1998). O PCNA, também conhecido como ciclina ou DNA-polimerase, é uma proteína encontrada em células em proliferação e atinge uma concentração máxima nas fases G1/S do ciclo celular e depois diminui nas fases G2/M. Em seres humanos e animais, a marcação IQ com PCNA é uma potencial ferramenta para o estudo da atividade proliferativa de tecidos, e pode ser realizada em espécimes fixados em formalina (PREZIOZI et al., 1995; ILHAN, METIN e BIRINCIOLU, 2008).

O marcador de proliferação Ki-67 é expressado em todas as fases do ciclo celular (LADSTEIN et al., 2010). A marcação desse anticorpo é de intensidade moderada a forte, apresentando padrão nuclear e com característica difusa, granular e/ou nucleolar. As figuras de mitose estão sempre bem coradas (CASTAGNARO et al., 1998).

O crescimento tumoral é um aumento localizado no número de células, em resultado ao aumento da atividade proliferativa e diminuição da apoptose e da necrose. *Bcl-2* e *bax* são dois membros distintos de uma família de genes que desempenham papel na regulação da apoptose. Estes dois genes possuem partes homólogas em uma sequência parcial de nucleotídeos. Entretanto, seus produtos individuais parecem ter funções distintas: a proteína *Bcl-2* é um fator supressor da apoptose, enquanto a *bax* é considerada promotora de apoptose (MADEWELL et al., 2001). A distribuição da *Bcl-2* ocorre em diversos tecidos, realizando o papel na prevenção da morte celular programada. Em um estudo utilizando 200 tumores felinos de vários tipos histológicos, a proteína *Bcl-2* foi mais difundida em adenomas de tireóide, carcinomas de mama e em linfomas. Na pele, a *Bcl-2* foi expressa em todos os

tumores basocelulares, mas em nenhum carcinoma de células escamosas (MADEWELL et al., 1999; MADEWELL et al., 2001).

## **1.1. JUSTIFICATIVA**

Em função de suas altas taxas de incidência e mortalidade, lesões tumorais neoplásicas em felinos representam um sério problema de saúde na medicina veterinária. Devido à disponibilidade de material biológico necessário para este estudo, surgiu o interesse em investigar possíveis alterações histopatológicas e histoquímicas desses tumores, bem como, obter parâmetros comparativos que possam auxiliar na discriminação dos níveis de diferenciação das lesões contribuindo, desta forma, como parâmetros auxiliares no diagnóstico.

## **1.2. OBJETIVOS GERAIS**

Caracterizar sob o ponto de vista histopatológico, histoquímico e imunoistoquímico, as neoplasias mamárias de ocorrência espontânea em gatas (*Felis catus*).

## **1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar os tipos tumorais encontrados;
- Determinar o grau citológico e histológico das lesões;
- Analisar a distribuição dos seguintes parâmetros histopatológicos: presença de necrose, infiltrado inflamatório, figuras de mitose e invasão glandular;
- Avaliar o padrão histoquímico dos depósitos de colágeno e glicosaminoglicanos associados aos tumores;
- Analisar o perfil imunoistoquímico das proteínas PCNA, Ki-67 e Bcl-2 associadas aos tumores.

## ***Revisão de Literatura***

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. NEOPLASIAS EM ANIMAIS DOMÉSTICOS**

O conhecimento na área de oncologia veterinária vem crescendo muito. Esse conhecimento torna-se essencial à medida que os animais têm vivido cada vez mais devido aos avanços da medicina veterinária e estão, conseqüentemente, mais expostos ao risco de desenvolverem neoplasmas. Além disso, atualmente os proprietários buscam mais longevidade e melhor qualidade de vida para seus animais (MAGALHÃES et al., 2009).

Um tumor pode ser definido como uma massa anormal de tecido cujo crescimento é excedente e desordenado em relação aos órgãos normais e que persiste na mesma maneira excessiva após a cessação dos estímulos que provocaram a alteração (THOMSON, 1983).

As neoplasias ocorrem quando um grupo de células não obedece aos mecanismos normais de controle do crescimento, crescendo de maneira independente dos aspectos normais de um tecido ou órgão. O novo crescimento sempre compromete a função do órgão no qual ocorre, ou de órgãos adjacentes através de pressão ou substituição do tecido normal funcional (WEINBERG, 2007).

O processo fisiológico do ciclo celular envolve a interação organizada de proteínas codificadas por um grande número de genes. Destacam-se entre estas proteínas, as ciclinas e as enzimas que fosforilam (cinases) ou desfosforilam (fosfatases) outras proteínas, levando a ativação ou inibição de suas funções. Este grande número de proteínas é necessário para que as mensagens do meio extracelular sejam veiculadas para o núcleo da célula e para que, uma vez que a célula inicie seu processo de duplicação, se constitua toda a maquinaria celular necessária para levar a cabo esse processo (STARINK e HAUSMAN, 1984). Os genes responsáveis por estimular este processo de duplicação celular podem, por sua vez, causar alterações que levam à sua hiperativação, como por exemplo: a) adição (inserção) ou subtração (deleção) de material genético; b) por um aumento de seu número de cópias (amplificação); ou c) por alteração de uma única base nitrogenada (substituição). Estas alterações, ao aumentar a função destes genes podem, portanto, acarretar uma desregulação do processo de divisão celular na direção de um aumento desordenado da proliferação celular. (STARINK e HAUSMAN, 1984; LOURO et al., 2002).

Vários oncogenes já foram descritos e as funções de seus proto-oncogenes originais foram localizadas em vários processos necessários para a regulação do ciclo celular (LOURO et al., 2002), como por exemplo:

- Receptores de membrana celular para fatores de crescimento exógeno (HER2/NEU/erb B2);
- Receptores para hormônios esteróides (ER) ou retinóides;
- Proteínas que transmitem a informação oriunda de receptores de membrana estimulados pela ligação de fatores de crescimento extracelulares, até o núcleo da célula (fatores de transcrição), onde se complexam com o DNA de certos genes nas suas porções reguladoras (regiões promotoras) estimulando ou inibindo a formação de RNA mensageiro (transcrição).

Várias outras etapas do ciclo celular podem ser alteradas pela ação de oncogenes. Portanto, alterações moleculares em proto-oncogenes, ao transformá-los em oncogenes, levam um ganho de função, sendo que a ativação de apenas uma das cópias de um proto-oncogene já é suficiente para influir positivamente no processo de divisão celular (LOURO et al., 2002).

As neoplasias podem ser classificadas dentro de duas categorias básicas: neoplasias benignas e malignas, podendo ser de origem epitelial ou mesenquimatosa. Há necessidade de padronização de nomenclatura para as neoplasias, porque certos tipos de tumores têm comportamentos clínicos relativamente previsíveis, que respondem de forma mais efetiva a certos tipos de tratamento. Os tumores são nomeados de acordo com sua célula do tecido de origem, padrão de crescimento e comportamento biológico que é deduzido das relações históricas conhecidas entre certas características morfológicas e desfechos clínicos (Tabela 01) (JONES, HUNT e KING, 2000).

Em geral, tumores benignos são designados com o sufixo *oma* na célula de origem. Os tumores de células mesenquimais geralmente seguem esta regra. Por exemplo, um tumor benigno que surge a partir de células fibroblásticas é chamado de *fibroma*, um tumor cartilaginoso é chamado de *condroma*, e um tumor dos osteoblastos é *osteoblastoma*. A nomenclatura de tumores epiteliais benignos é mais complexa, eles são classificados de modo diverso: alguns com base nas suas células de origem, outros em sua arquitetura microscópica, outros ainda nos seus padrões macroscópicos (KUMAR, ABBAS e FAUSTO, 2005).

A nomenclatura dos tumores malignos segue essencialmente o mesmo esquema usado para os neoplasmas benignos, com adição de algumas expressões. Os tumores malignos que surgem no tecido mesenquimal são geralmente chamados de sarcomas (grego, sar = carnosos) porque apresentam pouco estroma conjuntivo e são carnosos (ex: fibrossarcoma, leiomiossarcoma). Os neoplasmas malignos originados a partir de células epiteliais, derivadas de qualquer uma das três camadas germinativas, são chamados de *carcinomas* (CAPEN, 2002). Assim, o tumor que surge na epiderme de origem ectodérmica é um carcinoma, do

mesmo modo que um câncer de origem mesodérmica nos túbulos renais e um tumor derivado de células endodérmicas do revestimento do trato gastrointestinal. Os carcinomas podem ser ainda mais qualificados (JONES, HUNT, KING, 2000). Um com um padrão de crescimento microscopicamente glandular é chamado de *adenocarcinoma*, e um tumor que produza células escamosas identificáveis surgindo em qualquer epitélio do corpo é chamado de carcinoma de células escamosas. Uma prática comum é especificar, quando possível, o tecido de origem (ex: adenocarcinoma de células renais, carcinoma de células escamosas broncogênicas). Não raramente, porém, um câncer é formado por células indiferenciadas cujo tecido de origem é desconhecido, e designado apenas como um tumor maligno pouco diferenciado ou indiferenciado (SLOOTEN et al., 1985; POWER, 2001; WEINBERG, 2007).

Nos neoplasmas benignos e nos malignos bem indiferenciados, as células parenquimatosas apresentam uma grande semelhança entre si, como se todas derivassem de uma única célula. Raramente, uma diferenciação divergente de uma única linhagem de células parenquimatosas em outros tecidos dá origem aos chamados *tumores mistos*. O melhor exemplo disto é o *tumor originado de glândula salivar*. Estes tumores contêm componentes epiteliais dispersos dentro de um estroma mixóide que às vezes contém ilhas de cartilagem aparente ou até mesmo osso (KUMAR, ABBAS e FAUSTO, 2005).

A grande maioria dos neoplasmas, mesmo os tumores mistos, é formada por células representativas de uma única camada germinativa. Os teratomas, em comparação, são formados por uma variedade de tipos celulares parenquimatosos, que representam mais de uma camada germinativa, em geral, as três. Eles surgem a partir de células totipotentes e, portanto são encontrados principalmente nas gônadas; ocorrem raramente em células primitivas sequestradas de outros lugares. Estas células totipotentes se diferenciam em diversas linhagens celulares, produzindo tecidos que podem ser identificados, por exemplo: pele, músculo, gordura, intestino, epitélio, estruturas dentárias. Um padrão especialmente visto no teratoma cístico de ovário (cisto dermóide) é o que se diferencia principalmente em linhas ectodérmicas para criar um tumor cístico revestido por pele com cabelo, glândulas sebáceas e estruturas dentárias (KUMAR, ABBAS e FAUSTO, 2005).

**Tabela 01: Nomenclatura de tumores comumente encontrados nos animais. (BARBARA, POWERS e DERNEL. 1998; KUMAR, ABBAS e FAUSTO, 2005).**

<b>TECIDO DE ORIGEM</b>	<b>BENIGNO</b>	<b>MALIGNO</b>
<b>Tecido de origem mesenquimal (tecido conjuntivo e derivados)</b>		
	Fibroma	Fibrossarcoma
	Lipoma	Lipossarcoma
	Condroma	Condrossarcoma
	Osteoma	Sarcoma osteogênico
<b>Tecidos endoteliais e relacionados</b>		
Vasos sanguíneos	Hemangioma	Angiossarcoma
Vasos linfáticos	Linfangioma	Linfangiossarcoma
Sinóvia		Sarcoma sinovial
Mesotélio		Mesotelioma
Meninges	Meningeoma	Meningeoma invasivo
<b>Células do sangue e congêneres</b>		
Células hematopoiéticas		Leucemias
Tecidos linfóides		Linfoma
<b>Músculo</b>		
Liso	Leiomioma	Leiomiossarcoma
Estriado	Rabdomioma	Rabdomiossarcoma
<b>Tumores de origem epitelial</b>		
Escamosas estratificadas	Papiloma de células escamosas	Carcinomas de células escamosas ou carcinoma epidermóide
Células basais da pele ou dos anexos		Carcinoma basocelular
Revestimento epitelial de glândulas e ductos	Adenoma Papiloma Cistoadenoma	Adenocarcinoma Carcinomas papilares Cistoadenocarcinoma
Vias respiratórias	Adenoma brônquico	Carcinoma broncogênico
Epitélio renal	Adenoma tubular renal	Carcinoma de células renais
Células hepáticas	Adenoma de células hepáticas	Carcinoma hepatocelular
Epitélio (transicional) do aparelho urinário	Papiloma de células transicionais	Carcinoma de célula transicional
Epitélio placentário	Mola hidatiforme	Coriocarcinoma

Algumas características microscópicas dos tumores são utilizadas para classificar ou indicar neoplasias benignas e malignas (Tabela 02). O tumor benigno geralmente cresce lentamente, causa poucos danos ao tecido adjacente e é encapsulado (sendo bem demarcado ou de característica peduncular). Este tipo de tumor cresce por expansão, raramente possui



característica infiltrativa. A neoplasia benigna causa compressão no tecido vizinho, e por definição, não provoca metástase (BARBARA, POWERS e DERNEL. 1998; KLAPWIJK, 2007).

As neoplasias benignas, devido às poucas alterações genéticas em relação à célula de origem, possuem células semelhantes ao tecido de origem, tecido pouco celular e com bastante matriz, sendo bem demarcado, causando compressão no tecido adjacente normal. Em relação às características celulares, possuem baixa relação núcleo/ citoplasma, o núcleo é pouco uniforme em relação ao tamanho e formato, nucléolo pequeno e taxa de mitose baixa (BARBARA, POWERS e DERNEL, 1998).

O tumor maligno geralmente possui crescimento rápido e causa vários danos às células vizinhas, provocando inflamação. Além disto, o crescimento acelerado prejudica o suprimento sanguíneo, causando necrose no centro da massa tumoral. Podem apresentar também ulcerações e inflamação severa. Geralmente este tipo de tumor não possui cápsula e causa infiltração e compressão no tecido vizinho. Possui várias alterações genéticas, o que muitas vezes faz com que o seu diagnóstico torne-se confuso. Possui bastante celularidade e pouca matriz, podendo ter células não completamente maduras (indiferenciadas), seu citoplasma e/ou núcleo pode apresentar-se bem variável em relação ao tamanho e formato (pleomórfico) ou podem apresentar nenhum formato celular conhecido (anaplasia). Finalmente, um tumor maligno pode espalhar-se para locais distantes (metástase) de sua origem (tumor primário) (BARBARA, POWERS e DERNEL. 1998; KLAPWIJK, 2007).

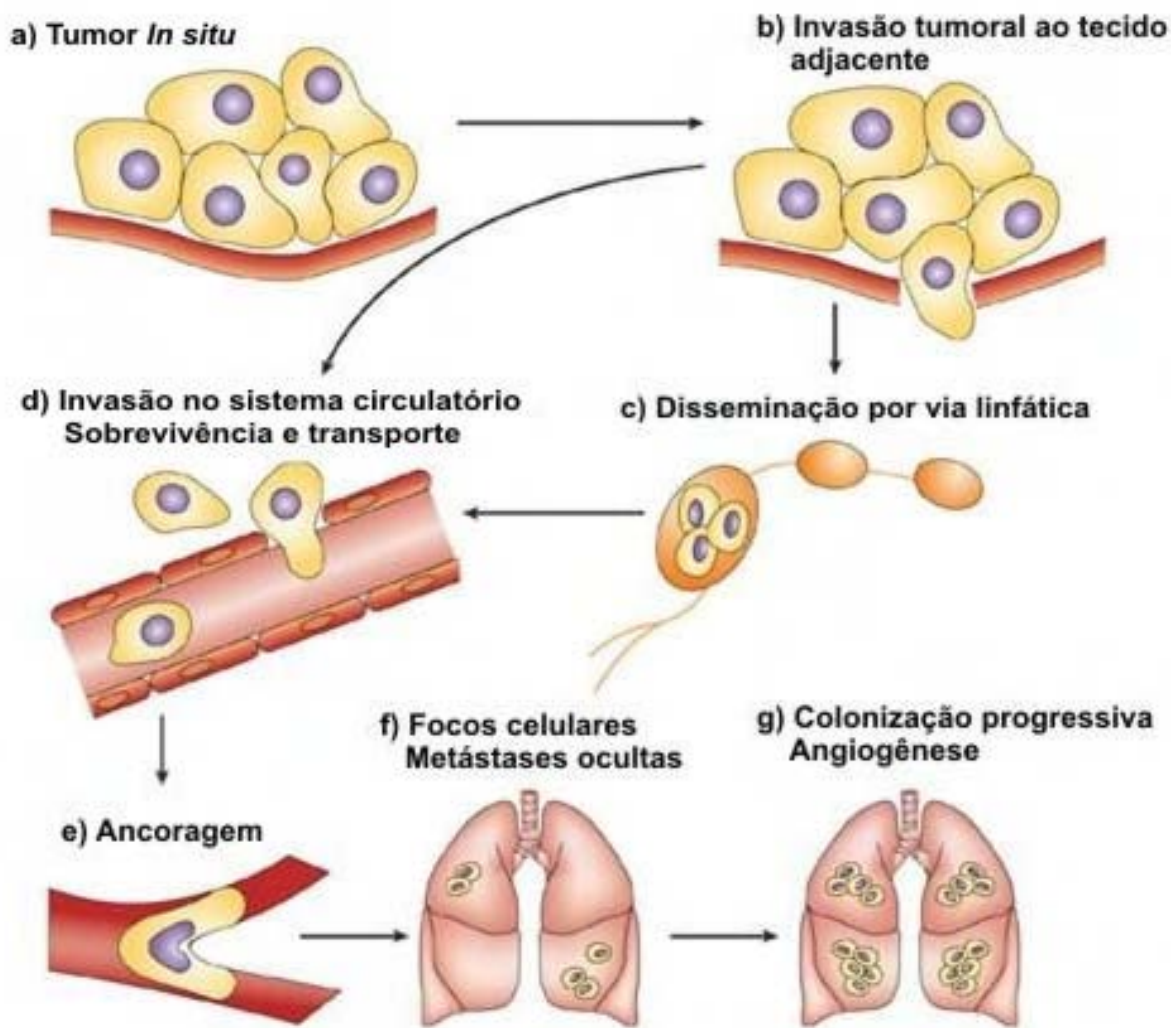
**Tabela 02: Critérios de distinção de tumores benignos e malignos (LOURO et al., 2002).**

<b>TUMORES BENIGNOS</b>	<b>TUMORES MALIGNOS</b>
Crescimento lento	Crescimento rápido
Poucos sinais de inflamação e necrose	Geralmente apresenta necrose
Encapsulado	Não encapsulado
Diferenciado (células semelhantes ao tecido de origem)	Indiferenciado, anaplástico, pleomórfico
Expansivo	Infiltrativo e invasivo
Margens definidas	Margens pouco definidas
Não apresenta metástase	Apresenta metástase

As metástases são, por definição, crescimentos neoplásicos secundários que ocorrem sem continuidade anatômica com a proliferação de origem (Figura 01). Para que ocorra uma metástase é necessário que a neoplasia seja maligna. Embora todas as neoplasias malignas tenham potencial metastático, apenas algumas o fazem, demonstrando o grau de dificuldade desse fenômeno. Em um estudo realizado com pacientes humanos que sofriam de câncer, apenas a presença de células neoplásicas no sangue não esteve associada a metástases, pois em média apenas 0,1% dessas células sobrevivem para a formação de focos neoplásicos secundários (SOUZA, 2005). Ou seja, a mera disseminação de células tumorais não leva, necessariamente, o desenvolvimento clínico de uma metástase (SUGARBAKER, 1979; WEISS, 1985; FIDLER, 1990; XIE e HUANG, 2003). É observado que muitas células que se despreendem de um tumor morrem rapidamente, fazendo com que poucas células consigam disseminar-se, sobreviver e proliferar para formar metástases distantes (FIDLER, 1970; GLAVES, 1986; PARIS et al., 1999; XIE e HUANG, 2003).

Uma das maiores causas de mortes relacionadas ao câncer é o aparecimento de metástase. A habilidade de uma célula metastática sobreviver poder ser atribuída a vários fatores, entre eles ao estresse do microambiente tumoral. A disseminação da neoplasia maligna se inicia pela invasão de células tumorais na matriz extracelular e nos vasos sanguíneos e linfáticos, sendo uma etapa necessária para a disseminação da neoplasia. A frágil estrutura vascular, como também a alta pressão favorece a liberação de células tumorais na circulação (XIE e HUANG, 2003). Aparentemente, tumores localizados próximos a vasos apresentam maiores chances de disseminação, não apenas por conta de sua localização, e sim porque o metabolismo é mais elevado (SHI e XIE, 2000; XIE et al., 2001).

Várias classes de proteínas estão envolvidas nos mecanismos que propiciam uma célula de um tumor maligno deslocar-se para regiões vizinhas durante o processo de metástase (COUSSINS E WERB, 1996; WERB, 1997; CHAMBERS e MATRISIAN, 1997; STELER-STEVENSON, 1999). As proteínas afetadas incluem as moléculas responsáveis pela adesão célula-célula (CAMs) – pertencentes à família das imunoglobulinas e as integrinas caderinas cálcio-dependentes – e as integrinas, responsáveis pela ligação das células aos substratos da matriz extracelular. Dessa forma, todas estas interações entre os mecanismos de aderência transmitem sinais regulatórios para a célula (HANAHAN e WEINBERG, 2000; APLIN et al., 1998).



**Figura 01:** Processo esquemático de metástase tumoral, iniciado por: a) Tumor *In situ* aderido a uma membrana intacta; b) A invasão necessita mudanças na interação célula-célula e célula-matriz extracelular, destruição de proteínas da matriz e estroma. Células tumorais metastáticas podem c) disseminar-se por via linfática, ou d) diretamente na circulação. e) Sobrevivência e ancoragem das células tumorais. f) Colonização de células metastáticas em locais distantes ao tumor satélite através de focos celulares, podendo ficar dormentes durante longos períodos de tempo, ocultando micrometástases. g) Metástase em crescimento progressivo e angiogênese. Fonte: STEEG (2003).

Outras proteases que participam do fenômeno da metástase são as metaloproteínas de matriz (MMPs). Em carcinomas, as MMPs são secretadas por células estromais recrutadas (macrófagos, mastócitos e fibroblastos) e células epiteliais neoplásicas. As enzimas em questão dissolvem as moléculas da matriz extracelular (MEC) que rodeiam e confinam células individuais dentro de tecidos, criando espaços para que essas células possam se mover (WEINBERG, 2007). Além dessa atividade, as MMPs podem estar envolvidas no crescimento de células tumorais através da ativação de fatores de crescimento, proteólise de fatores inibitórios e modulando eventos angiogênicos (ELLERBROEK e STACK, 1999).

Os mecanismos envolvidos no processo de metástase não são completamente entendidos. Para formar um crescimento metastático, uma célula cancerosa deve destacar-se do tumor primário, movendo-se para dentro da vasculatura a fim de migrar para outro local, extravasar dentro do parênquima ao redor e estabelecer crescimento. Durante tal processo, a célula deve evadir-se dos mecanismos de defesa do hospedeiro e sobreviver dentro da circulação. Teorias atuais sugerem que apenas certos clones dentro de um tumor desenvolvem todas as habilidades requeridas para a metástase, mas que tais clones provavelmente originam-se e disseminam-se em estágios iniciais do crescimento do tumor, com frequência, antes da detecção do tumor primário (MORRIS e DOBSON, 2007).

A disseminação dos tumores pode ser realizada através de três vias: implante direto nas cavidades ou nas superfícies, disseminação linfática e disseminação hematogênica (KUMAR, ABBAS e FAUSTO, 2005). O implante das cavidades e superfícies corporais pode ocorrer sempre que uma neoplasia maligna penetrar em um “campo aberto” natural. Na maioria das vezes, ocorre na cavidade peritoneal, no entanto o evento poderá ocorrer em qualquer outra cavidade – pleural, pericárdica, subaracnóide e espaço articular. Tal implante é especialmente característico de carcinomas que surgem nos ovários, quando, não raro, toda a camada peritoneal se torna revestida por uma camada vítrea de tumor (KUMAR, ABBAS e FAUSTO, 2005).

Todavia, a invasão tumoral não é suficiente para produzir metástases distantes. Para isto é necessário o transporte das células neoplásicas através dos vasos linfáticos e/ou sanguíneos (GEIGER e PEEPER, 2009). O transporte através dos vasos linfáticos é a via mais comum para disseminação de carcinomas e sarcomas. Os tumores não possuem vasos linfáticos funcionais, mas os vasos linfáticos localizados nas margens tumorais são suficientes para disseminação das células neoplásicas malignas (PANDERA et al., 2002).

A disseminação hematogênica é típica dos sarcomas, mas também é vista nos carcinomas. Em geral, a disseminação através de artérias é mais difícil, uma vez que a parede

desses vasos é mais espessa. Pode haver disseminação arterial, no entanto quando as células tumorais atravessam os leitos capilares pulmonares ou *shunts* arteriovenosos pulmonares ou quando as metástases pulmonares dão, elas mesmas, origem a ainda mais êmbolos tumorais (KUMAR, ABBAS e FAUSTO, 2005).

Com a invasão venosa, as células carregadas pelo sangue seguem o fluxo venoso de drenagem do local do neoplasma. Dessa forma, o fígado e os pulmões estão, com frequência, envolvidos secundariamente na disseminação hematogênica, uma vez que toda a drenagem porta flui para o fígado, e todo o sangue da cava flui para os pulmões. Os tumores que ocorrem muito próximos à coluna vertebral frequentemente embolizam através do plexo paravertebral, e esta via está provavelmente envolvida nas metástases vertebrais frequentes nos carcinomas de tireóide e próstata (KUMAR, ABBAS e FAUSTO, 2005).

Uma vez alojadas nos vasos sanguíneos de vários tecidos, células de câncer devem escapar do lúmen desses vasos e penetrar nos tecidos que os rodeiam, tal passo é denominado extravasação. O processo de extravasação depende de interações complexas entre as células tumorais e paredes dos vasos aos quais elas se tornam presas. Tais células podem usar várias estratégias para extravasar. Elas podem começar proliferando dentro do lúmen dos vasos, criando um pequeno tumor que cresce e, por fim, destrói a parede do vaso adjacente. Fazendo isso, elas empurram células endoteliais, pericitos e células do músculo liso que previamente separavam o lúmen do vaso do tecido que o circunda, sendo mais tarde chamado de parênquima (WONG E HYNES, 2006; WEINBERG, 2007).

A colonização, subsequente proliferação e angiogênese, juntos, representam a última etapa da invasão tumoral por metástase (WEINBERG, 2007). Após a colonização e a primeira proliferação de tumores secundários, a neoangiogênese é o fenômeno predominante. A neoangiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos que irão irrigar o tumor, provendo-o de nutrientes e remover os resíduos metabólicos. O estágio do crescimento tumoral anterior à angiogênese é denominado fase avascular. Um tumor sem vascularização é capaz de crescer de 1-2 mm. Já a fase vascular do tumor, onde os novos vasos já estão presentes e biologicamente ativos, é marcada pelo crescimento exponencial da neoplasia (EFFERTH, 2006; LEBER e EFFERTH, 2009).

## **2.2. NEOPLASIAS MAMÁRIAS EM FELINOS**

A ocorrência de neoplasias é um problema comum na prática da medicina veterinária de pequenos animais. Com a melhoria de práticas e investigações, doenças de cães e gatos são

cada vez mais diagnosticadas. Embora os dados sobre a incidência de tumores desses animais ainda sejam escassos, estimativas sugerem que um entre dez indivíduos irá desenvolver neoplasias durante seu período natural de vida. Os tumores mamários são comuns em pequenos animais. Ampla variedade de tipos histológicos ocorre em cães, embora de maioria benigna. Em gatos, a maioria dos tumores é maligna e muito agressiva (MORRIS e DOBSON, 2007).

A gata possui quatro pares de glândulas mamárias, sendo dois pares de mamas torácicas (T1 e T2), um par abdominal e um par inguinal. A drenagem linfática dos dois pares intermediários (T2 e abdominal) pode ser direcionada tanto para linfonodos inguinais superficiais quanto para os axilares, ao passo que no caso do primeiro par cranial (T1) a drenagem é exclusivamente conduzida para os linfonodos axilares, e no caso do par distal (inguinal), para os linfonodos inguinais. Além disso, nos três primeiros pares, a drenagem pode ser direcionada para os linfonodos esternais craniais. Estudos recentes demonstraram não haver conexões linfáticas entre as cadeias mamárias direita e esquerda ou entre as glândulas mamárias adjacentes (RAHARISON e SAUTET, 2005; RAHARISON e SAUTET, 2007; MAGALHÃES et al., 2009).

A glândula mamária consiste de ductos epiteliais e alvéolos situados entre tecido conectivo estromal. Ao redor de cada alvéolo estão as células mioepiteliais (MORRIS e DOBSON, 2007). Histologicamente, glândulas mamárias não-estimuladas (fora do período de lactação) em gatas adultas possuem uma pequena quantidade de estroma denso e gordura, com tecido glandular quase ausente. As glândulas torácicas demonstram ter um menor desenvolvimento que as glândulas abdominais. Os tetos são ricos em músculo liso e, histologicamente, possui arranjo de três camadas. Estruturalmente, as glândulas mamárias são formadas por lóbulos (separados por septos de tecido conjuntivo), cujos ductos drenam para canais excretores mais calibrosos (ductos lactíferos). O epitélio de revestimento dos ductos é duplo, onde as células podem ser cúbicas ou cilíndricas baixas. Os alvéolos das glândulas mamárias também são compostos por epitélio luminal e basal. As células epiteliais luminiais sintetizam e excretam proteínas lácteas e lipídeos durante a lactação, e as células basais ou mioepiteliais contraem-se, sob a influência da ocitocina, expelindo assim o leite. Além do tecido epitelial, ainda há a presença de fibroblastos e células adiposas que compõem e fazem a sustentação do tecido mamário. Essa formação é de extrema importância no estudo dos tumores mamários, pois existe uma relação direta entre seus componentes e o prognóstico da lesão (JOHNSTON, KUSTRITZ e OSLON, 2001; ZUCCARI et al., 2001; FIGUEIRA, 2003; PAYAN-CARREIRA e MARTINS-BESSA, 2008).

Com exceção dos tumores de pele e do tecido linfo-hematopoiético, os tumores de mamários são os mais comuns em felinos domésticos. A grande maioria dos tumores mamários nesta espécie é maligna com porcentagem variando de 85 a 90%. Dessa forma, essa patologia é apontada com uma das principais causas de morte de gatas de meia-idade e idosas (AMORIM et al., 2006; MAGALHÃES et al., 2009).

O carcinoma da glândula mamária da gata é o mais comum em qualquer outra espécie animal, com exceção do cão. Este tipo de tumor corresponde a 17% de todos os tumores que acometem a gata (AMORIM et al., 2006; MAGALHÃES et al., 2009). Os carcinomas mamários correm em gatas mais velhas, entre oito e doze anos de idade, com média, dez anos (Tabela 03). Não há predisposição racial estabelecida, embora alguns autores cite que em gatos siameses há o risco duas vezes maior do que todas as outras raças, além de desenvolver tumores mais precocemente (MOULTON, 1990; ITO et al., 1996; AMORIM et al., 2006; MAGALHÃES et al., 2009).

Há relatos que a ovariossalpingo-histerectomia (OSH) precoce de gatas poderia conferir um efeito protetor contra o desenvolvimento de neoplasias mamárias. A produção de hormônios femininos (estrógeno e progesterona) está ligada ao desenvolvimento de tumores mamários de cães e gatos. Em gatas inteiras, há um aumento do risco de tumores mamários de 7 vezes quando comparado àquelas castradas na puberdade (MORRIS e DOBSON, 2007). Gatas castradas até os seis meses de idade têm uma redução de até 91% do risco de desenvolver carcinomas mamários, no entanto, em animais castrados até um ano de idade esse risco diminui em 86% (OVERLEY et al., 2005; ZAPPULLI et al., 2005; MAGALHÃES et al., 2009). Estudos relacionados à expressão de receptores de estrógeno demonstram uma menor expressão em tumores mamários de felinos, apesar dos estrógenos endógenos aumentarem o risco de desenvolvimento de carcinomas mamários em gatas (CARDAZZO et al., 2005).

Progestágenos sintéticos como o acetato de megestrol oral e o acetato de medroxiprogesterona injetável são utilizados de maneira ampla como terapia de problemas dermatológicos, reprodutivos e comportamentais de felinos (PLUMB, 2008). Apesar dos benefícios terapêuticos dessas drogas, vários efeitos colaterais são relatados, entre eles: supressão adrenocortical, acromegalia, polidipsia, polifagia, *Diabetes mellitus* e patologias da glândula mamárias (MOORE e OGIVE, 2001; JACOBS et al., 2009).

**Tabela 03: Comparação entre os fatores de risco para carcinoma da glândula mamária de cães, gatos e mulheres (MULAS e REYMUNDO, 2000).**

FATOR	CÃO	GATO	MULHER
<b>Fatores Constitucionais</b>			
Idade	+	+	+
Raça/ etnia	+	+	+
Sexo	+	+	+
Fatores de origem familiar	+/-	?	+
Fatores reprodutivos	-/?	-/?	+
<b>Fatores hormonais</b>			
<b>Endógenos</b>			
Ovariossalpingo-histerectomia	+	+	+
Idade de realização da ovariossalpingo-histerectomia	+	+	+
<b>Hormônios exógenos</b>			
Estrógenos	-	-	+
Progestágenos	+	+	+
Hormônio do crescimento	+	+	+
Patologia mamária benigna anterior	?	?	+
<b>Fatores exógenos</b>			
Dieta	+	?	+

(+): correlacionado como fator de risco; (-): não correlacionado como fator de risco; (?) a correlação como fator de risco é desconhecida; (mais de um símbolo) – há divergências na literatura se o fator de risco contribui ou não ou é desconhecido na incidência de carcinomas mamários. \* *in vitro*.

A administração regular e prolongada de progestágenos em gatas com o objetivo de evitar o estro aumenta, de maneira significativa o risco de desenvolvimento de tumores mamários. Vários trabalhos relatam a forte relação entre o uso desses fármacos e o desenvolvimento de neoplasias malignas (ZAPPULLI et al., 2005; KESKIN et al., 2009). Embora a maioria dos casos ocorra em fêmeas, machos submetidos ao tratamento com medroxiprogesterona injetável (para tratamento de patologias comportamentais e urinárias) também podem desenvolver adenocarcinomas mamários. Um estudo apontou que 36% dos gatos machos submetidos à terapia injetável com progestágenos poderão desenvolver a doença (SKORUPSKI et al., 2005; JACOBS et al., 2009).

Diversos estudos apontam o papel hormônio do crescimento (GH) como mediador do desenvolvimento tumoral induzido por progestágenos em cães e gatos. A progesterona, endógena e exógena, demonstra estimular a produção do GH na glândula mamária. O GH produzido possui efeito endócrino, para/autócrino, como também exócrino. Tal efeito está envolvido na proliferação epitelial mamária e na tumorigênese (MOL et al., 1996; RIJNBERK e MOL, 1997; VAN GARDEREN et al., 1997; JACOBS et al., 2009). Além dos



efeitos hormonais descritos, receptores de progesterona estão presentes em tumores mamários de felinos. Dessa forma, a administração do progestágeno sintético pode promover o desenvolvimento/crescimento da neoplasia mamária (MAGALHÃES et al., 2009).

Aproximadamente 90% das neoplasias mamárias de felinos são carcinomas (Figura 02). Tais tumores são bastante invasivos, podem variar de nódulos bem circunscritos pequenos a massas ulceradas difusas, inflamadas, infiltradas e aderidos à pele. Pode estender-se para dentro da região inguinal e para baixo dos membros posteriores. A invasão dos vasos linfáticos e os linfonodos são achados de necropsia comuns nessa patologia. Vários estudos indicam que mais de 80% dos gatos com tumores mamários malignos apresentam metástase para um ou mais órgãos, entre eles: linfonodos, pulmões, pleura, fígado, diafragma, glândulas adrenais e rins (WITHROW e MACEWEN, 1996; MORRIS e DOBSON, 2007).

Segundo Morris e Dobson (2007), os carcinomas podem ser descritos como:

- Sólido: monocamadas de células densas.
- Tubular ou lobular: derivados dos alvéolos.
- Papilar: derivado do epitélio ductal e ocorrendo como ramificações papilares ou císticas.
- Anaplásticos: muito pleomórficos e com ausência de padrão definido.

A maioria dos tumores mamários de felinos é classificada como carcinomas simples, sendo que as apresentações histopatológicas mais frequentes são carcinomas túbulo-papilares, sólidos e cribriformes. Sarcomas, carcinoma de células escamosas e carcinomas mucinosos são menos comuns. Adenomas, mioepiteliomas e tumores mistos malignos são raros no gato, enquanto tumores mistos benignos são encontrados ocasionalmente. A proporção de tumores malignos e benignos é de 9:1. O crescimento é rápido e a maioria apresenta áreas de necrose. Em um estudo, 84,2% (n=48) dos carcinomas apresentavam comportamento invasivo (MILLANTA et al., 2002; MAGALHÃES et al., 2009).

Aproximadamente 86,4% (n=81) dos carcinomas mamários de gatas apresentam padrão micropapilar. Microscopicamente as lesões possuem principalmente células atípicas arranjadas em ninhos, estrutura papilar avascular e aglomerados de células em espaços vazios do tecido – mimetizando invasão linfática extensa. As células tumorais são de formato cubóide ou poligonal, possuem citoplasma abundante eosinofílico ou anfofílico e núcleo vesicular pleomórfico com nucléolo proeminente (SEIXAS et al., 2007).

Tumores Malignos	Carcinoma Não Infiltrativo ( <i>In situ</i> )	
	Carcinoma Túbulo-papilar	
	Carcinoma Sólido	
	Carcinoma Cribriforme	
	Carcinoma das Células Escamosas	
	Carcinoma Mucinoso	
	Carcinossarcoma	
	Carcinoma ou Sarcoma em Tumores Benignos	
Tumores Benignos	Adenoma	Adenoma Simples
		Adenoma Complexo
	Fibroadenoma	
	Tumor Misto Benigno	
Tumores Não Classificados	Papiloma Ductal	
Hiperplasias/ Displasias Mamárias	Hiperplasia Ductal	
	Hiperplasia Lobular	Hiperplasia Epitelial
		Adenose
		Alteração Fibroadenomatosa (Hipertrofia Mamária Felina, Hipertrofia Fibroepitelial)
	Cistos	
	Ectasia Ductal	
	Fibrose Focal (Fibroesclerose)	

**Figura 02: Classificação histológica de tumores mamários na espécie felina, definida pela OMS (MISDORP et al., 1999).**

O carcinoma mamário inflamatório é um tumor localizado de comportamento agressivo e prognóstico ruim. Clinicamente, possui sintomas característicos de um processo inflamatório (hiperemia, edema e aumento da temperatura da pele da glândula mamária). Tais condições podem, comumente, confundir o diagnóstico para uma dermatite ou mastite. O diagnóstico do carcinoma inflamatório pode ser confirmado através do exame histopatológico, onde é evidenciada embolia neoplásica nos vasos linfáticos dermais. O envolvimento dos vasos linfáticos (embolia) sem a presença de sinais clínicos de um processo inflamatório é denominado de carcinoma inflamatório oculto. Histologicamente, é visualizado infiltrado inflamatório (com grande quantidade de neutrófilos ou linfócitos, células plasmáticas e macrófagos), invasão dermal, edema, embolia neoplásica nos vasos linfáticos superficiais e hemorragia (PÉREZ-ALENZA et al., 2004).

Clinicamente, cerca de 25% dos tumores mamários felinos são ulcerados, sendo essa característica observada em 35% dos casos em um estudo e esteve associada a um menor tempo de sobrevivência (Figura 03) (AMORIM et al., 2006). Em outro trabalho, 75% das gatas com tumores ulcerados apresentavam metástases em linfonodos (MAGALHÃES et al., 2009).



**Figura 03: Aspecto macroscópico do carcinoma mamário de felinos (GIMÉNEZ et al., 2010).**

Carcinomas bifásicos epiteliais mioepiteliais (complexos) da glândula mamária são caracterizados pela presença de duas populações celulares: epiteliais luminiais e mioepiteliais. Tais tumores são observados frequentemente em caninos e possuem prognóstico melhor que os carcinomas simples. Carcinomas complexos da glândula mamária de felinos são raros e o prognóstico é desconhecido, uma vez que não há estudos suficientes que possibilitem a classificação do prognóstico baseado nos achados histopatológicos (MISDORP et al., 1999; RUTTEMAN et al., 2001). Macroscopicamente, os carcinomas complexos são massas sólidas

bem delimitadas que medem entre 0,8 a 4 cm de diâmetro. Sob o ponto de vista histopatológico, são neoplasmas bem delimitados (porém não encapsulados) e formam pequenos ninhos e redes misturados a estruturas ductulares, separados por um fino estroma fibroso. Possui padrão de crescimento trabecular, embora áreas tubulares e papilares-císticas (em menor proporção) também sejam observadas. Dois tipos celulares são identificados: central e luminal, cercado por uma contínua camada periférica de células neoplásicas mioepiteliais. As células epiteliais são pequenas e de formato cuboidal a oval com núcleos hipercromáticos de formato circular e citoplasma escasso. As células mioepiteliais podem apresentar formato circular, de fuso ou poliedral, com núcleo eucromático de tamanho variável com formato irregular e citoplasma com membrana indiferenciada (SEIXAS, PIRES e LOPES, 2008).

O carcinoma mucinoso é caracterizado pela produção abundante de mucina e são raros em felinos. Esses tumores podem ser simples ou complexos e possuem material mucino que é marcado positivamente pelo ácido periódico de Schiff (PAS). Através da coloração Hematoxilina-Eosina (HE) é possível verificar os seguintes achados histológicos: presença de muco basofílico a anfofílico (quando extracelular) e levemente eosinofílico quando a localização é intracelular. Dois subtipos de carcinomas mucinosos são encontrados em felinos, carcinomas mucinosos puros e não-puros (quando coexistem com outro tipo diferente de carcinoma) (SARLI, BRUNETTI e BENAZZI, 2006).

Na espécie felina, os tumores mamários são particularmente agressivos. Em geral, as metástases podem ocorrer em linfonodos regionais (83%), pulmões (83%), pleura (42%), fígado (24%) e outros órgãos abdominais, ossos, além das mamas adjacentes, sendo que o envolvimento do sistema linfático pode ser visto como cordões espessos e firmes na pele. Os linfonodos regionais podem estar aumentados se tiver ocorrido metástase, e por isso devem ser examinados cuidadosamente (MAGALHÃES et al., 2009). Além disso, a efusão pleural também está presente com relativa frequência e, em menor frequência, a linfadenopatia esternal. Sempre que seja removido fluido pleural, deve realizar-se uma análise citológica do mesmo, com o objetivo de pesquisar a presença de células neoplásicas malignas (PINTO, 2009).

Caso as neoplasias mamárias se localizem nos dois pares de glândulas mais caudais, deve pesquisar-se a presença de linfadenopatia metastática sub-lombar através de radiografia abdominal ou ultrassonografia. Aproximadamente 25% dos felídeos apresentam metástases abdominais em alguma fase do desenvolvimento do processo neoplásico (MORIS e DOBSON, 2007; PINTO, 2009).

As hiperplasias/displasias mamárias são um conjunto de lesões proliferativas e/ou degenerativas da glândula mamária, que, apesar de serem alterações não neoplásicas de comportamento benigno, podem confundir-se com alterações malignas (PINTO, 2009).

A hiperplasia fibroepitelial (fibroadenomatose, hipertrofia mamária felina, adenofibroma ou fibroadenoma) é uma proliferação benigna, não neoplásica dos ductos mamários e do tecido conjuntivo periductal de gatas jovens, geralmente com menos de dois anos de idade. Pode afetar uma ou mais glândulas mamárias, mas normalmente toda a cadeia mamária está envolvida. Esse distúrbio é mais comumente descrito em fêmeas no início da gestação ou naquelas que estão ciclando, mas tem sido observado, mais raramente, em machos, inteiros ou castrados, após administração prolongada de medicamentos à base de progestágenos. Embora a causa seja desconhecida, há evidências de que se trate de uma lesão hormônio-dependente, associada à ação de substâncias progestacionais naturais ou sintéticas. Macroscopicamente, as tumorações na glândula mamária são cobertas por pele, ocasionalmente ulceradas, e possuem superfície de corte brancacenta com nódulos multifocais mais pálidos de 2mm de diâmetro. Histologicamente, esses nódulos são multifocais e há crescimento abundante de tecido conjuntivo fibroso. (SOUZA et al., 2002).

Displasia cística mamária (doença fibrocística mamária, ectasia ductal mamária ou mastite) é uma rara mastopatia descrita em gatas adultas ou idosas; essa condição é caracterizada pelo aparecimento de cistos mamários volumosos contendo líquido claro, róseo ou azulado. Na maior parte dos casos, as lesões são encontradas em todas as mamas, podendo ocorrer o aparecimento de pequenos cistos em apenas uma ou duas glândulas mamárias. Entre os achados citológicos da lesão, observa-se grande quantidade de macrófagos carregados de grânulos basofílicos e pleomórficos. Microscopicamente, o tecido cístico possui intensa ectasia ductal, em algumas áreas com leve proliferação papilar formada por epitélio colunar simples. Macrófagos ricos em pigmento castanho e granular, semelhante à ceróide, estão presentes na luz dos ductos dilatados (FIGHERA et al., 2005).

Antes de considerar qualquer protocolo terapêutico definitivo, é importante avaliar o paciente através do exame físico. Além disso, uma completa contagem de células sanguíneas (hemograma completo), perfil bioquímico sérico e urinálise deverão ser realizados com o objetivo de avaliar o estado geral do indivíduo. Exames radiológicos e ultrassonográficos poderão ser utilizados para verificar a presença de metástases. O perfil de coagulação é indicado para pacientes com suspeita de carcinoma mamário inflamatório, devido à grande associação desse tipo de tumor com a coagulação vascular disseminada (NOVOSAD, 2003).

O diagnóstico presuntivo do tumor mamário deve ser feito no exame de clínico e palpação na maioria dos casos. Cuidado, entretanto deve ser tomado para diferenciar hipertrofia mamária e mastite (MORIS e DOBSON, 2007). O diagnóstico definitivo deverá ser realizado através do exame histopatológico de amostras obtidas por biópsia excisional (NELSON e COUTO, 2001). Apesar disso, alguns autores relatam 100% de concordância entre as avaliações cito e histopatológicas (AMORIM et al., 2006). Dessa forma, a citologia aspirativa por agulha fina pode ser considerada um importante exame de triagem (MAGALHÃES et al., 2009).

O fator mais importante para promover o controle eficiente de um felino com câncer mamário é o diagnóstico precoce. Dessa forma, a palpação da glândula mamária deve ser instituída na rotina do exame físico da medicina veterinária. Um correto diagnóstico deve ser estabelecido rapidamente e o tratamento deve ser iniciado imediatamente quando a alteração da glândula mamária for notada (AMORIM et al., 2006).

### **2.3. DIAGNÓSTICO, ESTADIAMENTO TUMORAL E PROGNÓSTICO DE NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE FELINOS**

Tumores mamários de gatas são avaliados através de critérios histológicos e clínicos. A correlação entre os achados clínicos e histológicos encontrados são importantes para avaliação do prognóstico do paciente. Entre os parâmetros, são avaliados: tamanho do tumor; tipo de crescimento e ocorrência de invasão tumoral; extensão da área de necrose; envolvimento de linfonodos; número de mitoses; variação e variações morfométricas do núcleo. Entretanto, um dos maiores desafios é realizar uma predição do comportamento da doença através desses parâmetros. Muitas informações podem ser adquiridas através de um grupo de pacientes com um padrão distinto de sobrevivência. Além disso, a reprodutibilidade da avaliação e da confiabilidade das variáveis morfológicas utilizadas para estabelecer um prognóstico (por exemplo, sistema de gradação histológica) aplicado aos tumores mamários de felinos tem, muitas vezes, sido afetada pela natureza subjetiva desses fatores (PREZIOSI et al., 2002).

Os fatores prognósticos mais importantes da neoplasia da glândula mamária, tanto para as mulheres e os felinos, são o tamanho do tumor e metástase para os linfonodos, os quais são significativamente correlacionados entre si (KUMAR, ABBAS e FAUSTO, 2005). A correlação estatisticamente significativa entre o tamanho do tumor e o período de sobrevivência pós-operatório dos gatos é um achado comum na prática na medicina veterinária (ITO et al., 1996). Estudos realizados por Viste e colaboradores (2002) relatam

que gatas com carcinomas mamários menores que 3 cm tiveram um período de vida pós-cirúrgico que variou de 3 a 54 meses. Neste caso, em função do grande intervalo do período de vida encontrado entre os pacientes estudados, o tamanho do tumor (menor que 3cm), avaliado como único parâmetro, mostrou-se de valor prognóstico limitado em gatos. Porém neoplasias mamárias malignas de grandes dimensões (maiores que 3 cm) apresentaram relevância muito maior como prognóstico, já que os animais já apresentaram período de sobrevivência variando entre 4 a 12 meses, representando dessa forma, de prognóstico ruim.

Os tumores dos animais domésticos são classificados através de estadiamento (Tabela 04) baseados no esquema TNM da Organização Mundial da Saúde (OMS), utilizado para tumores malignos de seres humanos. De acordo com a classificação TMN, **T** representa a extensão do tumor primário (tamanho, fixação pele ou fáscia); **N** descreve a condição dos linfonodos regionais e **M** designa a presença ou ausência de metástases (GIMÉNEZ et al., 2010).

**Tabela 04: Classificação clínica TNM de tumores mamários de felinos (OWEN, 1980).**

<b>T</b>	<b>Tumor Primário (avaliar múltiplos independentemente)</b>
	T0 – Nenhuma evidência de tumor
	T1 – Tumor < 2cm máximo de diâmetro
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ T1a – Não fixo</li> <li>▪ T1b – Fixo à pele</li> <li>▪ T1c – Fixo ao músculo</li> </ul>
	T2 – Tumor de 2-3 cm máximo de diâmetro
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ T2a – Não fixo</li> <li>▪ T2b – Fixo à pele</li> <li>▪ T2c – Fixo ao músculo</li> </ul>
	T3 - Tumor > 3 cm máximo de diâmetro
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ T3a – Não fixo</li> <li>▪ T3b – Fixo à pele</li> <li>▪ T3c – Fixo ao músculo</li> </ul>
	T4 - Tumor de qualquer tamanho (ou carcinoma inflamatório)
<b>N</b>	<b>Linfonodos regionais (RLN) – axilar, inguinal; avaliação clínica ou histológica</b>
	N0 – Nenhuma evidência de envolvimento
	N1 – Envolvimento ipsilateral
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ N1a – Não fixo</li> <li>▪ N1b – Fixo</li> </ul>
	N2 – Envolvimento bilateral
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ N2a – Não fixo</li> <li>▪ N2b – Fixo</li> </ul>
<b>M</b>	<b>Metástases distantes (avaliação clínica, radiográfica ou histológica)</b>
	M0 – Nenhuma evidência de metástase
	M1 – Metástases distantes incluindo linfonodos distantes

Os tumores podem ser classificados em quatro estádios (Tabela 05): **I** para tumores menores que dois centímetros e sem evidências de metástases em linfonodos ou em outros órgãos; **II** para tumores entre dois e três centímetros, sem metástases para linfonodos ou em outros órgãos; **III** tumores maiores que três centímetros, com ou sem metástases para linfonodos mas sem metástase para outros órgãos e **IV** para tumores de qualquer tamanho (ou carcinoma inflamatório), com ou sem metástases em linfonodos, mas com metástases em outros órgãos (MAGALHÃES et al., 2009).

**Tabela 05: Estadiamento clínico de tumores mamários de felinos baseado na classificação TNM (GIMÉNEZ et al., 2010).**

Estadiamento	Tamanho Tumoral	Envolvimento de linfonodos	Presença de metástases distantes
Estágio I (< 2cm)	T1	N0	M0
Estágio II (2-3 cm)	T2	N0	M0
Estágio III (> 3cm)	T3	N0-1	M0
Estágio IV	Tumor de qualquer tamanho ou carcinoma inflamatório	N0-1	M1

T1 = tumor < 2cm de diâmetro; T2 = tumor 2-3cm de diâmetro; T3 = tumor > 3cm diâmetro

N0 = ausência de metástase (histológica ou citológica) no linfonodos regionais; N1 = presença de metástase (histológica ou citológica) no linfonodos regionais.

M0 = sem evidência de metástase distante; M1 = sem evidência de metástase distante.

O exame histológico de tecido representativo de um tumor é o método mais adequado para o diagnóstico do câncer. A biópsia fornece ao patologista a oportunidade de examinar os componentes celulares do tumor, sua arquitetura e relacionamento com os tecidos adjacentes normais. Na maioria das circunstâncias, é preferível realizar o diagnóstico tumoral antes do tratamento, mesmo quando esse será cirúrgico, pois apenas quando a natureza da doença é conhecida, um tratamento adequado poderá ser planejado (MORRIS e DOBSON, 2007).

O sistema de gradação histológica para tumores mamários de felinos foi publicado baseado na: diferenciação celular e o grau de formação tubular; polimorfismo nuclear e frequência de figuras de mitose (CASTAGNARO et al., 1998). Tumores mamários são classificados como bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pobremente diferenciado (Tabela 06) (GIMÉNEZ et al., 2010).



A presença de figuras de mitose em um tecido tumoral é um fator prognóstico de grande valor. Os animais que apresentaram um longo tempo de sobrevida possuíam poucas figuras de mitose por campo no tecido tumoral (GIMÉNEZ et al., 2010).

Apesar de existirem poucos estudos que confirmem o valor prognóstico da avaliação através de gradação histológica em gatos (SEIXAS et al., 2011), um estudo realizado por Jeglum, de Guzman e Young (1985), evidenciou relação entre o tempo de sobrevida e classificação por gradação histológica. A taxa de mortalidade 1 ano após a realização da cirurgia foi de 0% em felinos que apresentaram carcinoma bem diferenciado e 100% naqueles que apresentaram carcinoma pobremente diferenciado. Dessa forma, a presença de um carcinoma moderadamente diferenciado não representa um mau prognóstico em relação ao tempo de sobrevida.

**Tabela 06: Gradação histológica de tumores mamários de felinos (GIMÉNEZ et al., 2010).**

<b>ACHADOS HISTOLÓGICOS</b>	<b>GRAUS DE DIFERENCIAÇÃO</b>
<b>• Graus de formação tubular</b>	
Alto (> 75%)	Bem diferenciado
Moderado (10-75%)	Moderadamente diferenciado
Pouca ou ausente (< 10%)	Pobremente diferenciada
<b>• Pleomorfismo nuclear/ celular</b>	
Núcleos e células pequenas, regulares e uniformes	Bem diferenciado
Aumento de tamanho moderado e variabilidade do tamanho	Moderadamente diferenciado
Variação e variabilidade marcantes em relação ao tamanho	Pobremente diferenciada
<b>• Quantidade de figuras de mitose por campo*</b>	
0-7	Bem diferenciado
8-14	Moderadamente diferenciado
> 15	Pobremente diferenciada

\* O campo é visualizado na objetiva 40X em microscopia óptica (aumento de 400X)

A utilização de biomarcadores na medicina veterinária, a cada dia, se torna essencial para um diagnóstico mais preciso e auxílio na realização do prognóstico da patologia oncológica. Biomarcadores podem ser conceituados como uma molécula biológica encontrada no sangue (ou em outro fluido corporal) ou em tecidos em processos fisiológicos ou patológicos – podendo ser indicativos da presença de uma determinada doença

(MOBASHERI e CASSIDY, 2010). O potencial de aplicação de biomarcadores na identificação de câncer em pacientes veterinários inclui: diagnóstico, estadiamento, determinação do prognóstico e monitoramento da resposta da terapia (HENRY, 2010). A expressão de alguns genes, receptores ou proteínas poderá estar alterada durante um processo maligno nos tumores mamários de gatas. Então, estes marcadores biológicos poderão ser detectados por imunoistoquímica e, com isso, fornecer informações sobre o prognóstico dos casos (GIMÉNEZ et al., 2010).

As técnicas imunoistoquímicas são uma ferramenta poderosa ao dispor do diagnóstico anatomo-patológico e da investigação. Não obstante, a imunoistoquímica é um meio de se obter o diagnóstico e frequentemente serve de complemento para o raciocínio diagnóstico, sem substituí-lo. O prognóstico e a indicação terapêutica são muito condicionados pelos recursos dessas técnicas. De um modo geral, os antígenos que podem ser expressos pelas diferentes patologias já são conhecidos e estudados, sendo necessário, muitas vezes, detectar sua existência para confirmar a patologia correspondente (FERRO, 2007).

Tem havido grande interesse pelo uso de marcadores biológicos associados ao carcinoma de mama que apresentem valor prognóstico. Muitos desses marcadores, inicialmente detectados apenas bioquimicamente, podem ser pesquisados em tecidos fixados em formalina pelo uso da imunoistoquímica (IQ) ou da hibridação *In situ*. Nesta categoria ampla, estão inseridas proteínas e enzimas, algumas associadas com oncogenes e com o potencial de mensurar a atividade proliferativa no tumor (SALES, RODRIGUES e BACCHI, 2004).

O câncer é uma doença de origem genética e epigenética. Dessa forma, técnicas laboratoriais para detecção de DNA, RNA ou alterações de proteínas poderão ser aplicadas para auxílio do diagnóstico do câncer e auxiliar na predição do prognóstico da doença. Uma técnica utilizada rotineiramente pelos patologistas é a imunoistoquímica, que tem sido muitas vezes aplicada para detectar alterações nos parâmetros genéticos que poderiam oferecer correlação com a evolução da patologia. Marcadores de proliferação, como o Ki-67 e PCNA, têm sido extensivamente utilizados, mas com resultados variáveis. Em geral, o Ki-67 (Clone MIB 1) indica melhor, quando comparado com o PCNA, a correlação com o prognóstico do câncer mamário de cadelas (PEÑA et al., 1998; SARLI et al., 2002; DE MATOS et al., 2006; DAGLI, 2008). Oncogenes e genes supressores tumorais têm sido explorados como marcadores prognósticos. As mutações e o acúmulo da proteína p53 também podem ser úteis para prever maior potencial maligno e prognóstico ruim em tumores mamários de animais domésticos (LEE et al., 2004). A superexpressão do oncogene c-erbB-2 está correlacionada

com o diagnóstico histopatológico de malignidade, mas não com a presença de invasão local ou de doença metastática regional (AHERN et al., 1996).

Ao contrário do que ocorre na doença em humanos, as marcações imunoistoquímicas ER e PR (receptor de estrógeno e progesterona, respectivamente), não são utilizadas no prognóstico e diagnóstico de rotina de carcinomas mamários de caninos e felinos. No entanto, a partir de poucos estudos sobre esses receptores em tumores da glândula mamária de carnívoros domésticos, dois fatos foram evidenciados: tumores mamários caninos possuem perfis de marcação para ER e PR e correspondentes implicações prognósticas semelhantes aos de carcinoma de mama de seres humanos. Os carcinomas da glândula mamária de gatas são ER-negativos e PR-positivos. Assim, carcinomas da glândula mamária de cadelas e gatas têm características hormônio-dependentes comuns aos tumores mamários de mulheres (MULAS et al., 2002).

O crescimento tumoral é um aumento localizado no número de células, em resultado ao aumento da atividade proliferativa e diminuição da apoptose e necrose. O Bcl-2 e *bax* são dois membros distintos de uma família de genes que desempenham papel na regulação da apoptose. Estes dois genes possuem partes homólogas em uma sequência parcial de nucleotídeos, entretanto, seus produtos individuais possuem funções distintas: Bcl-2 é um fator supressor de apoptose, enquanto *bax* é considerado um promotor de apoptose (BRADY e GIL-GOMEZ, 1998; FADEEL et al., 1999; MADEWELL et al., 2001). A distribuição do Bcl-2 ocorre em diversos tecidos, realizando o papel na prevenção da apoptose. Em um estudo utilizando 200 tumores felinos de vários tipos histológicos, a proteína Bcl-2 foi mais difundida em adenomas de tireóide, carcinomas de mama e linfomas. Na pele, Bcl-2 foi expresso em todos os tumores basocelulares, mas em nenhum dos carcinomas de células escamosas (MADEWELL et al., 1999; MADEWELL et al., 2001).

Ciclina A é um gene que regula o ciclo celular e é comumente expressado em tumores mamários malignos de cães e em carcinomas mamários de felinos. Em um estudo preliminar, anormalidades gênicas em ciclina A foram detectadas em 7/8 dos carcinomas mamários. No entanto, em um estudo mais aprofundado, o envolvimento da ciclina A em tumores mamários felinos foi detectado em apenas 48,6% dos carcinomas mamários felinos, sugerindo que a ciclina A pode estar associada com a tumorigênese (MURAKAMI et al., 2000; GIMÉNEZ et al., 2010).

Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é um fator angiogênico liberado por tumores e está envolvido no crescimento, invasão e metástase tumoral (SAHIN, 2000). No câncer de mama humano foi verificado que os tumores com altos níveis de VEGF são

biologicamente mais agressivos. Este fator também foi estudado em tumores mamários felinos, e sua expressão foi maior em carcinomas pouco diferenciados. Este achado sugere que o VEGF poderia ser um marcador útil para prever o resultado clínico em gatos com tumores mamários (GASPARINI, 2000; GIMÉNEZ et al., 2010).

A ciclo-oxigenase (COX), também conhecida como prostaglandina endoperóxido sintetase, é uma enzima-chave da via biossintética para a conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas. Duas formas de COX estruturalmente diferentes foram identificadas e caracterizadas: COX-1 e COX-2. A superexpressão COX-2 tem sido documentada em muitas doenças neoplásicas malignas em seres humanos. A maioria dos tumores mamários de felinos expressa COX-2 e sua expressão está associada a um prognóstico ruim (SAYASITH, SIROIS e DORE, 2009; GIMÉNEZ et al., 2010).

## *Referências*

### 3. REFERÊNCIAS

- AHERN, T.E.; BIRD, R.C.; BIRD, A.E.; WOLFE, L.G. Expression of the oncogene c-erb-2 in canine mammary cancers and tumor-derived cell lines. *American Journal of Veterinary Research*, v. 57, p. 693-696, 1996.
- AMORIM, F. V.; SOUZA, H. J. M.; FERREIRA, A. M. R.; FONSECA, A. B. M. Clinical, citological and histopathological evaluation of mammary masses in cats from Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 8, p. 378-388, 2006.
- APLIN, A. E.; HOWE, A.; ALAHARI, S. K.; JULIANO, R. L. Signal transduction and signal modulation by adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin, cell adhesion molecules and selectins. *Pharmacological Reviews*, v. 50, p. 197-263, 1998.
- BARBARA, B.; POWERS, E.; DERNELL, W. S. Tumor biology and pathology. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, v. 13, n. 1, p. 4-9, 1998.
- BRADY, H.J.M.; GIL-GÓMEZ, G. Molecules in focus. Bax. The pro-apoptotic Bcl-2 family members, Bax. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 30, p. 647-650, 1998.
- CAPEN, C. C. Tumors of the endocrine glandule. In: MEUTEN, D. J. *Tumor in domestic animals*. 4. ed. Iowa: Ames, 2002.
- CARDAZZO, B.; ZAPULLI, V.; FRANSINETI, F.; PATARNELLO, T.; CASTAGNANO, M.; BARGELLONI, L. Full-length sequence and expression analysis of estrogen receptor  $\alpha$  mRNA in feline mammary tumors. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, v. 96, p. 106-119, 2005.
- CASTAGNARO, M.; CASALONE, C.; BOZZETA, E.; DE MARIA, R.; BIOLATTI, B.; CARAMELLI, M. Tumour grading and the one-year-post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. *Journal of Comparative Pathology*, v. 119, p. 263-275, 1998.
- CLAMBERS, A. F.; MATRISIAN, L. M. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 89, p. 4240-4245, 1997.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *Chemistry & Biology*, v. 3, p. 895-904, 1996.

DAGLI, M.L.Z. The search for suitable prognostic markers for canine mammary tumors: a promising outlook. *The Veterinary Journal*, v. 177, p. 3-5, 2008.

DE MATOS, A.J.; LOPES, C.C.; FAUSTINO, A.M.; CARVALHEIRA, J.G.; DOS SANTOS, M.S.; RUTHERMAN, G.R.; GARTNER, M.F. MIB-1 labeling indices according to clinical-pathological variables in canine mammary tumours: a multivariate study. *Anticancer Research*, v. 26, p. 1821-1826, 2006.

EFFERTH, T. *Molekulare pharmakologie und toxikologie*. Berlin: Springer, 2006. 328 p.

ELLERBROEK, S. M.; STACK, M. S. Membrane associated matrix metalloproteinases in metastasis. *Bioessays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, v. 21, p. 940-949, 1999.

FADEEL, B.; ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S. All along the watchtower: on the regulation of apoptosis regulators. *FASEB*, v. 13, p. 1647-1657, 1999.

FERRO, A.J.B. *Técnicas Imunocitoquímicas*. Lisboa: Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, 2007. 101p.

FIDLER, I. J. Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowers Memorial Award Lecture. *Cancer Research*, v. 50, p. 6130-6138, 1990.

FIDLER, I. J. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with <sup>125</sup>I-5-iodo-2'-dioxuridina. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 45, p. 773-782, 1970.

FIGHERA, R. A.; SOUZA, T.M.; CARTAGNA, L. M.; IRIGOYEN, L. F. Displasia cística mamária de uma gata. *Ciência Rural*, v. 35, n. 2, p. 478-480, 2005.

FILGUEIRA, K. D. *Características anatomopatológicas de neoplasias mamárias em cadelas criadas no município de Fortaleza-CE*. 2003. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2003.

GASPARINI, G. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *The Oncologist*, v. 5, suppl. 1, p. 37-44, 2000.

GEIGER, T. R.; PEEPER, D. S. Metastasis mechanism. *Biochemica et Biophysica Acta*, v. 1796, p. 293-308, 2009.

GIMÉNEZ, F.; HERCHT, 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.

GLAVES, D. Intravascular death of disseminated cancer cells mediated by superoxide anion. *Invasion Metastasis*, v. 6, p. 101-111, 1986.

HAMPE, J.F.; MISDORP, W. Tumours and dysplasias of the mammary gland. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 50, p. 111-133, 1974.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmark of cancer. *Cell*, v. 100, p. 57-70, 2000.

HENRY, C.J. Biomarkers in veterinary cancer screening: applications, limitations and expectations. *The Veterinary Journal*, v. 185, n. 1, p. 10-14, 2010.

IHAN, F.; METIN, N.; BIRINCIOGLU, S. T. Immunohistochemical detection of PCNA and p53 in mammary tumours and normal tissues in dogs. *Revue de Médecine Vétérinaire*, v. 159, p.298-304, 2008.

ITO, T.; KADOSAWA, T.; MOCHIZUKI, M.; MATSUNAGA, S.; NISHIMURA, R.; SASAZI, N. Prognosis of malignant mammary tumor in 53 cats. *Journal of Veterinary Medicina Science*, v. 58, n. 8, p. 723-726, 1996.

JACOBS, T. M.; HOOPE, B. R.; POEHMANN, C. E.; JACKIE, D. F.; SORENMO, K. U. Mammary adenocarcinomas in three male cats exposed to medroxyprogesterone acetate (1990-2006). *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 12, n. 2, 2009.

JEGLUM, K.A.; DE GUZMAN, E.; YOUNG, K.M. Chemotherapy of advanced mammary adenocarcinoma in 14 cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 187, 157-160, 1985.



JOHNSON, S. D.; KUSTRITZ, M. U. R.; OSLOM, P. N. S. *Canine and feline theriogenology*. Philadelphia: Saunders, 2001. 592 p.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. *Patologia veterinária*. 6. ed. São Paulo: Manole, 2000. 1415p.

KESKIN, A.; YILMAZBAS, G.; YILMAZ, R.; OZYIGIT, M.O. GUMEN, A. Pathological abnormalities after long-term administration of medroxyprogesterone acetate in a queen. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 11, p. 518-521, 2009.

KLAPWIJK, J. Neoplasia – all you wanted to know but were afraid to ask. *Comparative Clinical Pathology*, v. 16, p. 25-27, 2007.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. *Patologia – bases patológicas das doenças*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 1592p.

LADSTEIN, R. G.; BACHMANN, I. M.; STRAUME, O.; AKSLEN, L. A. Ki-67 expression is superior to mitotic count and novel proliferation markers PHH3, MCM4 and mitosin as prognostic factor in thick cutaneous melanoma. *BMC Cancer*, v. 10, p. 140-155, 2010.

LEBER, M. F.; EFFERTH, T. Molecular principles of cancer invasion and metastasis. *International Journal of Oncology*, v. 34, n. 4, p. 881-895, 2009.

LEE, C.H.; KIM, W.H.; LIM, J.H.; KANG, M.S.; KIM, D.Y; KWEON, O.K. Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. *Journal of Veterinary Science*, v. 5, p. 63-69, 2004.

LOURO, I. D.; LLERENA-JR, J. C.; MELO, M. S. V.; ASHTON-PROLLA, P.; CONFORTI-FROES, N. *Genética molecular do câncer*, 2. ed., São Paulo: MSG Produção Editorial, 2002. 275p.

MADEWELL, B.R.; GANDOUR-EDWARDS, R.; EDWARD, B.F.; MATTHEWS, K.R.; GRIFFEY, S.M. Bax/Bcl-2: cellular modulation of apoptosis in feline skin and basal cell tumours. *Journal of Comparative Pathology*, v. 124, p. 115-151, 2001.

MADEWELL, B.R.; GANDOUR-EDWARDS, R.; EDWARDS, B.F.; WALLS, J.E.; GRIFFEY, S.M. Topographic distribution of Bcl-2 protein in feline tissues in health and neoplasia. *Veterinary Pathology*, v. 36, p. 565-573, 1999.

MAGALHÃES, M.; OLIVEIRA, F. S.; HAKATA, A.; COSTA, F.V.A. Neoplasmas mamários em gatas – revisão de literatura. *Clínica Veterinária*, v. 79, p. 48-52, 2009.

MILLANTA, F.; LAZZERI, G.; MAZZEI, M.; VANNOZZI, I.; POLI, A. MIB-1 labeling index in feline dysplastic and neoplastic mammary lesions and its relationship with postsurgical prognosis. *Veterinary Pathology*, v. 36, n. 6, 619-636, 2002.

MISDORP, W.; ELSE, R.W.; HELLMÉN, E.; LIPSCOMB, T.P. Histological classification of the dog and the cat. In: \_\_\_\_\_. *International histological classification of tumors of the domestic animals*. 2. ed. Washington: World Health Organization and Armed Forces Institute of Pathology, 1999. pp. 11–56.

MOBASHERI, A.; CASSIDY, J. P. Biomarkers in veterinary medicine: toward, targeted, individualized therapies of companion animals. *The Veterinary Journal*, 185, p. 1-3, 2010.

MOL, J. A.; VANGARDEREN, E.; RUTTERNAN, G. R.; RIJNBERK, A. New insights in molecular mechanism of progestin-induced proliferation of mammary epithelium: induction of the local biosynthesis of growth hormone (GH) in the mammary gland of dogs, cats and humans. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 57, p. 67-71, 1996.

MOORE, A. S.; OGIVE, G. K. Mammary tumors. In: OGIVE, G. K; MOORE, A. S. (eds.) *Feline oncology: a comprehensive guide to compassionate care*. Trenton: Veterinary Learning Systems, 2001. 503p.

MORRIS, J.; DOBSON, J. *Oncologia em pequenos animais*. São Paulo: Roca, 2007. 300 p.

MOULTON, J. E. Tumors of the mammary gland. In: \_\_\_\_\_. *Tumors in domestic animals*. 3. ed. Berkley: University of California Press, 1990. pp. 547-552.

MULAS, J.M.L.; REYMUNDO, C. Animal models of human breast carcinoma: canine and feline neoplasms. *Clinical and Translational Oncology*, v. 2, p. 274-281, 2000.

MULAS, J.M.L.; NIEL, M.V.; MILLÁN, Y.; ORDÁS, J.; BLANKESTEIN, M.A.; MIL, F.V.; MISDORP, W. Progesterone receptors in normal, dysplastic and tumorous feline oestrogen receptors status. *Research in Veterinary Science*, v. 72, p. 153-161, 2002.

MURAKAMI, Y.; TATEYAMA, S.; RUNGSIPIPAT, A.; UCHIDA, K.; YAMAGUCHI, R. Immunohistochemical analysis of cyclin A, cyclin D1 and p53 in mammary tumors,

squamous cell carcinomas ad basal cell tumors of dogs and cats. *The Journal of Veterinary Medical Science*, v. 62, p. 753-750, 2000.

NAUMOV, G. N.; WILSON, S.; MacDONALD, I. C.; SCHMIDT, E. E.; MORRIS, V. L.; GROOM, A. C.; HOFFMAN, R. M.; CHAMBERS, A. F. Cellular expression of green fluorescent protein, coupled with high-resolution in vivo videomicroscopy to monitor steps in tumor metastasis. *Journal of Cell Metastasis*, v. 112, n. 12, p. 1835-1842, 1999.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. *Fundamentos de medicina interna de pequenos animais*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 1084 p.

NOVELLINO, A.T.N.; AMORIM, R.F.B.; QUEIROZ, L.M.G. Análise da imunoexpressão do PCNA e p53 em carcinoma de células escamosas oral: correlação com a gradação histológica de malignidade e características clínicas. *Acta Cirurgica Brasileira*, v.18, n. 5, p. 458-464, 2003.

NOVOSAD, C. A. Principles of treatment for mammary gland tumors. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, v. 18, n. 2, p. 107-109, 2003.

OVERLEY, B.; SHOFER, F. S.; GOLDSCHIMIDT, M. H.; SHERER, D.; SORENMO, K. V. Association between ovariectomy and feline mammary carcinoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 19, n. 4, p. 560-563, 2005.

OWEN, L.N. *TMN classification of tumors in domestic animals*. Geneva: World Health Organization, 1980. 53p.

PANDERA, T. P.; KADAMBI, A.; TOMASO, E.; CARREIRA, C. M.; BROWN, E. B.; BOUCHER, Y.; CHOI, N. C.; MATHISEN, D.; WAIN, J.; MARK, E. J.; MUNN, L. L.; JAIN, R. K. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science*, v. 296, n. 5574, p. 1883-1886, 2002.

PARIS, S.; WILSON, S.; MacDONALD, I. C.; DELPECH, B.; THIBERVILLE, L.; MARTIN, J. P.; DIARRA-MEHRPOUR, M. A model of spontaneous lung metastasis visualised in fresh host tissue by green fluorescent protein expression. *Clinical & Experimental Metastasis*, v. 17, n. 10, p. 817-822, 1999.

PAYAN-CARREIRA, R.; MARTINS-BESSA, A. C. M. Ultrasonographic assessment of the feline mammary gland. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 10, p. 466-471, 2008.

PEÑA, L.L.; NIETO, A.I.; PEREZ-ALENZA, D.; CUESTA, P.; CASTAÑARO, M. Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 10, p. 237-246, 1998.

PÉREZ-ALENZA, M. D.; JIMÉNEZ, A.; NIETO, A. I.; PEÑA, L. First description of feline inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical characteristics of three cases. *Breast Cancer Research*, v. 6, n. 4, p. R300- R307, 2004.

PINTO, R. M. M. O. *Neoplasias mamárias de cadelas e gatas*. 2009. 99f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2009.

PLUMB, D. C. *Plumb's veterinary drug handbook: Desk Edition*. 6. ed. Oxford: Blackwell, 2008. 1136 p.

POWER, B. E. The pathology of neoplasia. In: WITHROW, S. J.; MACEVEN, E. G. *Small animal clinical oncology*. 3. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001.

PREZIOSI, R.; SARLI, G.; BENAZZI, C.; MANDRIOLI, L.; MARCATO, P. S. Multiparametric survival analysis of histological stage and proliferative activity in feline mammary carcinomas. *Research in Veterinary Science*, v. 73, p. 53-60, 2002.

PREZIOZI, R.; SARLI, G.; BENAZZI, C.; MARCATO, P. S.; Detection of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in canine and feline mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology*, v. 113, p. 301-313, 1995.

RAHARISON, F.; SAUTET, J. Lymph drainage of mammary glands on female cats. *Journal of Morphology*, v. 267, n. 3, p. 292-299, 2005.

RAHARISON, F.; SAUTET, J. The topography of the lymph vessels of mammary glands in female cats. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, v. 36, n. 6, p. 442-452, 2007.

RIJNBERK, A.; MOL, A. Progesterin-induced hypersecretion of growth hormone: an introductory review. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, v. 51, p. 335-338, 1997.

RUTTERMAN, G. R.; WITHROW, S. J.; MacEWEN, E. G. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S. J.; MacEWEN, E. G. (eds.). *Small animal clinical oncology*. 3. ed. Philadelphia: Saunders, 2001. pp. 467-473.

SAHIN, A.A. Biologic and clinical significance of HER-2/neu (cerb-2) in breast cancer. *Advances in Anatomic Pathology*, v. 7, p. 158-166, 2000.

SALES, A.O.; RODRIGUES, S.J.P.; BACCHI, C.E. Estudo comparativo entre os métodos LSAB ®+ e Herceptest ® para detecção de HER-2/neu em carcinomas de mama. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 40, n. 4, p. 265-271, 2004.

SALLES, M. A.; CÚRCIO, V. S.; PEREZ, A. A.; GOMES, D. S.; GOBBI, H. Contribuição da imuno-histoquímica na avaliação de fatores prognósticos e preventivos do câncer de mama e no diagnóstico de lesões mamárias. *Jornal Brasileiro de Medicina Laboratorial*, v. 45, p. 213-222, 2009.

SARLI, G.; BRUNETTI, B.; BENAZZI, C. Mammary mucinous carcinoma in the cat. *Veterinary Pathology*, v. 43, p. 667-673, 2006.

SARLI, G.; PREZIOSI, R.; BENAZZI, C.; CASTELLANI, G.; MARCATO, P.S. Prognostic value of histologic stage and proliferative activity in canine malignant mammary tumors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 14, p. 25-34, 2002.

SAYASITH, K.; SIROIS, J.; DORE, M. Molecular characterization of feline COX-2 and expression in feline mammary carcinomas. *Veterinary Pathology*, v. 46, p. 423-429, 2009.

SEIXAS, F.; PALMEIRA, C.; PIRES, M. A.; LOPES, C. Are complex carcinoma of the feline mammary gland and other invasive mammary carcinoma identical tumours? Comparison of clinicopathologic features, DNA ploidy and follow up. *Research in Veterinary Science*, v. 84, p. 428-433, 2008.

SEIXAS, F.; PALMEIRA, C.; PIRES, M. A.; LOPES, C. A. Mammary invasive micropapillary carcinoma in cats: clinicopathologic features and nuclear DNA content. *Veterinary Pathology*, v. 44, n. 6, p. 842-848, 2007.

SEIXAS, F.; PALMEIRA, C.; PIRES, M.A.; BENTO, M.J.; LOPES, C. Grade is an independent prognostic factor for feline mammary carcinomas: A clinicopathological and survival analysis. *The Veterinary Journal*, v. 187, n.1, p. 65-71, 2011.

SEIXAS, F.; PIRES, M. A.; LOPES, C. A. Complex carcinomas of the mammary gland in cats: pathological and immunohistochemical features. *The Veterinary Journal*, v. 176, p. 210-215, 2008.

SHI, Q.; XIE, K. Experimental animal models for pancreatic cancer. *International Journal of Oncology*, v. 17, p. 217-225, 2000.

SKORUPSKI, K. A.; OVERLEY, B.; SHOFER, F. S.; GOLSCHIMIDT, M. G.; MILLER, C. A.; SORENMO, K. U. Clinical characteristics of mammary carcinoma in male cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 19, p. 52-55, 2005.

SOUZA, T. M. *Estudo retrospectivo de 761 tumores cutâneos em cães*. 2005. 296 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

SOUZA, T. M.; FIGHERA, R. A.; LANGOHR, I. M.; BARROS, C. S. L. Hiperplasia fibroepitelial mamárias em felinos: cinco casos. *Ciência Rural*, v. 32, n. 5, p. 891-894, 2002.

STARINK, T. M.; HAUSMAN, R. The cutaneous pathology of extrafacial lesions in Cowden's disease. *Journal of Cutaneous Pathology*, v. 11, p. 338-344, 1984.

STEEG, P. S. Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nature Reviews Cancer*, v. 3, p. 55-63, 2003.

STELLER-STEVENSON, W. G. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target of therapeutic intervention. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 103, p. 1237-1241, 1999.

STOOLER, H. V.; SCHABERG, A.; SMEENK, D.; MOOLENAAR, A. J. Morphologic characteristics of benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer*, v. 4, p. 766, 773, 1985.

SUGARBAKER, E. V. Cancer metastasis: a product of tumor-host interactions. *Current Problems in Cancer*, v. 3, p. 1-59, 1979.

THOMSON, RG. *Patologia Geral Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983, 412p.

VAN GARDEREN, E.; WIT, M.; VOORHOUT, W.F.; RUTTEMAN, G. R.; Mol, J. A.; NEDERBRAGT, H.; MISDORP, W. Expression of growth hormone in canine mammary tissue and mammary tumors. Evidence for potential autocrine/ paracrine stimulatory loop. *The American Journal of Pathology*, v. 150, p. 1037-1047, 1997.

VISTE, J.R.; MYERS, S.L. SINGH, B.; SIMKO, E. Feline mammary adenocarcinoma: tumor size as a prognostic indicator. *The Canadian Veterinary Journal*, v. 43, p. 33-37, 2002.

WEINBERG, R. A. *A biologia do câncer*. São Paulo: Artmed, 2007. 844p.

WEISS, L. *Principles of metastasis*. Orlando: Academic Press, 1985. 425 p.

WERB, Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell*, v. 91, n. 4, p. 439-442, 1997.

WERNER, B.; CAMPOS, A. C.; NADJI, M.; TORRES, L. F. B.; Uso prático da imuno-histoquímica em patologia cirúrgica. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 41, p.353-364, 2005.

WITHROW, S. J.; MacEWEN, E. G. *Small animal clinical oncology*. 2. ed. Philadelphia: Saunders, 1996. 589p.

WONG, S. Y.; HYNES, R. O. Lymphatic or hematogenous dissemination: how does a metastatic tumor cell decide? *Cell Cycle*, v. 5, p. 812-817, 2006.

XIE, K.; HUANG, S. Regulation of cancer metastasis by stress pathways. *Clinical & Experimental Metastasis*, v. 20, p. 31-43, 2003.

XIE, K.; WANG, B.; SHI, Q.; ABBRUZZESE, J. L.; XIONG, Q.; LE, X. Mouse models of metastatic pancreatic adenocarcinoma. *International Journal of Pancreatology*, v. 29, n. 1, p. 21-35, 2001.

ZAPPULLI, V.; ZAN, G.; CARDAZZO, B.; BARGELLONI, L.; CASTAGNARO, M. Feline mammary tumors in comparative oncology. *Journal of Dairy Research*, v. 72, p. 98-106, 2005.

ZUCCARI, D. A. P. C.; SANTANA, S.; ROCHA, N. S. Fisiopatologia da neoplasia mamária em cadelas. *Clínica Veterinária*, v. 2, p. 50-54, 2001.



***Artigos***

## 4. ARTIGOS

Os artigos produzidos, em resultado ao trabalho de tese, serão submetidos à publicação no periódico *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*.

### 4.1. Caracterização histopatológica de tumores mamários espontâneos de gatas (*Felis catus*)

[*Histopathologic characterization of spontaneous mammary tumors in cats (Felis catus)*]

G.V. Schirato<sup>1,2</sup>, V.R. Silva<sup>3</sup>, R.C. Menezes<sup>4</sup>, E.L. Ribeiro<sup>5</sup>, C.A. Peixoto<sup>5</sup>, C.O. Neves<sup>6</sup>, M.R. Melo-Júnior<sup>6</sup> e A.L.F. Porto<sup>7\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil.

<sup>2</sup>Biotério Experimental, Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Brasil.

<sup>3</sup>Hospital Veterinário, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil.

<sup>4</sup>Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses, Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Brasil.

<sup>5</sup>Laboratório de Ultra-estrutura, Departamento de Entomologia, Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Brasil.

<sup>6</sup>Departamento de Patologia, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

<sup>7</sup>Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil.

\*Autor para correspondência: Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos. Recife, PE

– Brasil. CEP: 52171-900. Telefone: +55 81 33206391, Fax: +55 81 21268485. E-mail: [analuporto@yahoo.com.br](mailto:analuporto@yahoo.com.br).

## RESUMO

Com exceção dos tumores de pele e do tecido linfo-hematopoiético, os neoplasmas mamários são os mais comuns em felinos domésticos. Os carcinomas mamários de gatas possuem prognóstico desfavorável, uma vez que tais tumores são bastante agressivos e com grande capacidade de gerar metástases. Objetivou-se com esse estudo, caracterizar sob o ponto de vista histopatológico, neoplasias mamárias de ocorrência espontânea em gatas (*Felis catus*) oriundas da casuística do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco, período de 2008 a 2010. Trinta e cinco amostras de tecido neoplásico mamário de gatas foram obtidas por ressecção cirúrgica (mastectomia simples ou dissecação em bloco). Os cortes histológicos foram corados pela Hematoxilina-Eosina (HE) e as lâminas foram analisadas em microscopia de luz. Observou-se que 14,29% das lesões foram classificadas como benignas e 85,71% como adenocarcinomas. Entre as lesões de característica benigna (n=5), foram classificadas como: 60% fibroadenomas, 20% como adenoma simples e 20% como adenose. Os adenocarcinomas apresentavam em sua maioria (86,87%) presença de necrose e tal sinal esteve presente em grande parte (superior a 30%) do tecido neoplásico em 50% dos casos. Enquanto, 40% (n=2) das lesões benignas apresentavam pequenos focos de necrose. Em relação à presença de infiltrado inflamatório, nenhuma lesão benigna apresentou este sinal. No entanto, 100% dos carcinomas apresentavam infiltrado inflamatório, classificado de moderado a intenso em 56,66% amostras. A presença de figuras de mitose foi evidenciada tanto em lesões malignas quanto em lesões benignas, no entanto, visualizada em maior número em adenocarcinomas ( $5,33 \pm 2,29$  mitoses por campo) e  $0,8 \pm 0,45$  em lesões de característica benigna ( $P = 0,006$ ). A maioria dos neoplasmas felinos apresenta característica

de malignidade, gradação histológica alta, evidenciando um mau prognóstico para os indivíduos portadores.

**Palavras-chave:** Neoplasias mamárias; Caracterização histopatológica; carcinoma; *Felis catus*.

## ABSTRACT

After skin tumors and lymphohematopoietic tissue, mammary neoplasms are most common in domestic cats. Mammary carcinomas of cats have poor prognosis, since such tumors are very aggressive and with great ability to generate metastases. The aim of this study was to characterize the point of view histopathologic, spontaneously occurring mammary tumors in cats (*Felis catus*) originated from patients of the Veterinary Hospital of Universidade Federal de Pernambuco, period 2008 to 2010. Thirty-five samples of breast tumor tissue of cats were obtained by surgical resection (mastectomy or dissection in the block). Sections were stained with hematoxylin-eosin (HE) and the slides were examined under light microscopy. It was observed that 14.29% of the lesions were classified as benign and 85.71% as adenocarcinomas. Among the characteristic lesions of benign (n = 5) were classified as fibroadenomas 60%, 20% as a single adenoma and 20% as adenosis. Adenocarcinomas showed necrosis (86.87%) and this signal was present in most (over 30%) of neoplastic tissue in 50% of cases. While 40% (n = 2) of the benign lesions showed small foci of necrosis. Regarding the presence of inflammatory infiltrate, no benign lesion showed this sign. However, 100% of carcinomas showed inflammatory infiltration, classified as moderate to severe in 56.66% samples. The presence of mitotic figures was evident not only in malignant lesions as benign lesions, however, seen in greater numbers in adenocarcinomas ( $5.33 \pm 2.29$  mitoses) and  $0.8 \pm 0.45$  in lesions characteristic benign ( $P = 0.006$ ). Most feline neoplasms

characteristic features of malignancy, histological high, indicating a poor prognosis for affected individuals.

**Key words:** Breast cancer; histopathologic characterization; carcinoma; *Felis catus*.

## INTRODUÇÃO

O carcinoma da glândula mamária da gata é o mais comum em qualquer outra espécie animal, com exceção do cão. Este tipo de tumor corresponde a 17% de todos os tumores que acometem a gata (Amorim et al., 2006; Magalhães et al., 2009). Os carcinomas mamários ocorrem em gatas mais velhas, entre oito e doze anos de idade, com média, dez anos. Não há predisposição racial estabelecida, embora alguns autores cite que em gatos siameses há o risco duas vezes maior do que todas as outras raças, além de desenvolver tumores mais precocemente (Moulton, 1990; Ito et al., 1996; Amorim et al., 2006; Magalhães et al., 2009).

O diagnóstico presuntivo do tumor mamário deve ser feito no exame de clínico, palpação na maioria dos casos. Entretanto, deve ser tomado o cuidado para diferenciar hipertrofia mamária e mastite (Morris e Dobson, 2007). O diagnóstico definitivo deverá ser realizado através do exame histopatológico de amostras obtidas por biópsia excisional (Nelson e Couto, 2001).

Os carcinomas mamários de gatas possuem diversos padrões histológicos, ou uma mistura deles em um mesmo tumor (Seixas et al., 2007). Tais tumores são compostos por células epiteliais luminais e ocorrência de carcinomas complexos é rara (Misdorp et al., 1999; Seixas et al., 2008). Macroscopicamente possuem consistência firme e nodular, sendo simples ou múltiplos e as glândulas caudais dos animais são as mais acometidas. Pelo menos 25% das gatas afetadas possuem neoplasias ulcerativas (Magalhães et al., 2009).

A maioria dos tumores mamários de felinos é classificada como carcinomas simples, sendo que as apresentações histopatológicas mais frequentes são carcinomas túbulo-papilares,

sólidos e cribriformes. Sarcomas, carcinoma de células escamosas e carcinomas mucinosos são menos comuns (Millanta et al., 2002; Magalhães et al., 2009). Em função da característica de alta malignidade, o diagnóstico desta patologia deve ser realizado precocemente e de maneira precisa para que se inicie a terapia antitumoral o mais rápido possível, uma vez que tais condições influenciam diretamente no tempo de sobrevivência do paciente (Giménez et al., 2010).

Na espécie felina, os tumores mamários são particularmente agressivos. Em geral, as metástases podem ocorrer em linfonodos regionais (83%), pulmões (83%), pleura (42%), fígado (24%) e outros órgãos abdominais, ossos, além das mamas adjacentes, sendo que o envolvimento do sistema linfático pode ser visto como cordões espessos e firmes na pele. Os linfonodos regionais podem estar aumentados se tiver ocorrido metástase, e por isso devem ser examinados cuidadosamente (Magalhães et al., 2009). Além disso, a efusão pleural também está presente com relativa frequência e, em menor frequência, a linfadenopatia esternal. Sempre que seja removido fluido pleural, deve realizar-se uma análise citológica do mesmo, com o objetivo de pesquisar a presença de células neoplásicas malignas (Pinto, 2009).

Objetivou-se com esse estudo, caracterizar sob o ponto de vista histopatológico, neoplasias mamárias de ocorrência espontânea em gatas oriundas da casuística do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco no período de 2008 a 2010.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

As amostras de tecido neoplásico mamário de gatas foram obtidas por ressecção cirúrgica (mastectomia simples ou dissecação em bloco) de animais oriundos da casuística do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (HV, DMV, UFRPE) no período de 2008 a 2010. Os 35 tumores coletados foram fixados em formalina 10% preparada

em tampão PBS 7,2 e posteriormente, as amostras foram submetidas ao processamento histológico de rotina e incluídas em parafina.

Após microtomia, os cortes (4 $\mu$ m) foram corados pela Hematoxilina-Eosina (HE), para estudo histopatológico. As lâminas coradas com HE foram analisadas em microscopia de luz. A classificação tumoral foi realizada de acordo com a OMS (Misdorp et al., 1999), onde foram considerados os aspectos histopatológicos mais pronunciados.

Para determinação do Grau Histológico e Grau Citológico dos carcinomas mamários foi considerado o seguinte escore: HI = Carcinoma bem diferenciado; HII = Carcinoma moderadamente diferenciado; HIII = Carcinoma pouco diferenciado ou indiferenciado. Ao graduar os carcinomas em três grupos, são separados os tumores de possível comportamento biológico mais favorável (HI) e os de provável prognóstico desfavorável (HIII) daqueles do grupo intermediário (HII), cujo comportamento é difícil de ser previsto (Rosen e Oberman, 1993).

O grau citológico foi classificado em: C1 = carcinomas anaplásicos, com intensa atipia nuclear e numerosas mitoses; C2 = moderada atipia nuclear; C3 = leve atipia nuclear, raras mitoses (Rosen e Oberman, 1993).

Os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão ( $M \pm dp$ ), submetidos ao teste Tukey, através do software PRISM 3.0, aceitando como estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de 5%.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Clinicamente, as lesões mamárias das gatas, apresentavam-se como massas sólidas únicas ou múltiplas, com tamanho  $2,16 \pm 0,64$  cm (lesões benignas) e  $1,98 \pm 0,73$  (carcinomas) e, em sua maioria, não ulceradas. Em relação à idade, as portadoras de lesões mamárias benignas possuíam  $2,5 \pm 1,91$  anos e acometidas por carcinoma:  $9,94 \pm 2,26$  anos

( $P = 0,002$ ). Nenhum animal incluído no estudo foi submetido à terapia anti-neoplásica prévia.

Entre as 35 lesões mamárias de felinos estudadas, 14,29% destas foram classificadas quanto ao critério biológico como benignas e 85,71% como malignas. Entre os tipos tumorais encontrados (Tab. 1), predominantemente, as lesões neoplásicas eram carcinomas sólidos em 51,43% dos casos, seguidos pelos carcinomas túbulo-papilares (14,29%) (Fig. 1). Entre as lesões de característica benigna ( $n=5$ ), foram classificadas como: 60% fibroadenomas, 20% como adenoma simples e 20% como adenose.

As lesões malignas eram multifocais, padrão de crescimento predominantemente invasivo, com presença marcante de anisocitose, necrose de moderada a intensa, figuras de mitose e infiltrado inflamatório. Entre tais parâmetros histopatológicos encontrados (Tab. 2), os adenocarcinomas apresentavam em sua maioria (86,87%) presença de necrose e tal sinal esteve presente em grande parte (superior a 30%) do tecido neoplásico em 50% dos casos. Enquanto, 40% ( $n=2$ ) das lesões benignas apresentavam poucos focos de necrose.

Em relação à presença de infiltrado inflamatório, nenhuma lesão benigna apresentou este sinal. No entanto, 100% dos carcinomas apresentavam infiltrado inflamatório, classificado de moderado a intenso em 56,66% amostras. As lesões mamárias malignas apresentavam invasão glandular em 46,67% dos casos.

A presença de figuras de mitose (Fig. 2 e 3) foi evidenciada tanto em lesões malignas quando em lesões benignas, no entanto, visualizada em maior número em adenocarcinomas ( $5,33 \pm 2,29$  mitoses por campo) e  $0,8 \pm 0,45$  em lesões de característica benigna ( $P = 0,006$ ).

O grau histológico e citológico dos adenocarcinomas também foi avaliado (Fig. 4 e 5). Em relação ao grau histológico, 3,33% (1/30) foram classificadas como HI, 46,67% (14/30) como HII e 50% (15/30) como HIII. Ao graduar os carcinomas em três grupos, são separados os tumores de possível comportamento biológico mais favorável (HI) e os de provável



prognóstico desfavorável (HIII) daqueles do grupo intermediário (HII), cujo comportamento é difícil de ser previsto.

Em relação ao grau citológico, 23,33% (7/30) das neoplasias malignas apresentavam grau C1 (apresentando-se como carcinomas anaplásicos, com intensa atipia nuclear e numerosas mitoses) e 76,67% (23/30) foram classificadas como C2, sendo caracterizadas por moderada atipia nuclear. O sistema de gradação do grau citológico é o oposto do grau histológico, ou seja: C1 representa pior prognóstico e C3 melhor prognóstico quando comparado às demais classificações.

Os tumores mamários de gatas (*Felis catus*) representam a terceira principal neoplasia nessa espécie, depois das neoplasias de pele e as de origem linfo-hematopoiética (Giménez et al., 2010). Dentre estes, os carcinomas são as neoplasias mais comuns, representando 80-90% dos casos. Tais tumores são malignos e bastante agressivos, com alta capacidade de metástase e apresentam prognóstico ruim – sendo uma importante causa de mortalidade, principalmente em animais de meia-idade e idosos (Amorim et al., 2006; Seixas et al., 2007).

Neoplasias epiteliais malignas originam-se de células epiteliais dos ductos mamários maiores, ductos interlobulares, ductulos intralobulares, e epitélio secretório dos ácinos (alvéolos). Em geral, ocorrem três padrões de proliferação (acinar, tubular e papilar), mas em muitos casos pode-se observar mais de um padrão em diferentes regiões da neoplasia. Cada tipo também pode estar acompanhado por uma proliferação concomitante de células mioepiteliais circundadas por uma matriz condromucínica (Jones et al., 2000). Em cadelas, os carcinomas mamários apresentam células neoplásicas apresentando pleomorfismo, anisocariose e uma elevada taxa de índice mitótico (> 4 mitoses por ampliação de 400X), com áreas multifocais de necrose (Klopjleisch et al., 2010).

Em tumores mamários de felinos, o tipo tumoral de maior prevalência é carcinoma simples, sendo que as apresentações histopatológicas encontradas são carcinomas túbulo-papilares, sólidos e cribriformes (Millanta et al., 2002; Magalhães et al., 2009).

Após a avaliação histopatológica das lesões mamárias neoplásicas de gatas do presente estudo, constatou-se que a maioria das neoplasias eram carcinomas simples de padrão histopatológico sólido. Também foram encontrados tumores com padrões histopatológicos diferentes na mesma neoplasia: carcinoma sólido com áreas túbulo-papilares, carcinoma túbulo-papilar com áreas sólidas e carcinoma em tumor benigno (adenoma complexo).

A gradação histológica é um bom parâmetro para estratificar os tumores de acordo com sua agressividade biológica (Karayannopoulou et al., 2005). Em humanos, a combinação do tipo e grau histológicos fornece uma avaliação mais acurada do prognóstico do câncer de mama, quando comparada com a avaliação histopatológica com único meio de diagnóstico. O grau histológico também pode fornecer informações úteis para prever a resposta à quimioterapia e, portanto, ser um fator preditivo (Ellis et al., 2003).

Seixas e colaboradores (2011) verificaram que HIII foi o grau histológico mais prevalente em neoplasias mamárias de felinos. Tal grau, segundo os autores, é associado a um pior prognóstico, resultando menor tempo sobrevida dos animais após a remoção cirúrgica dos tumores. Tais resultados corroboram com os encontrados no presente estudo, uma vez que 50% das neoplasias mamárias das gatas foram classificadas no grau HIII.

O grau de diferenciação nuclear, também denominado de “grau citológico ou nuclear”, é uma análise que leva em conta a morfologia nuclear da célula neoplásica, representando um importante parâmetro prognóstico para carcinomas mamários em humanos e animais (De Vico e Maiolino, 1997; Simeonov e Simeonova, 2009). Castagnaro e colaboradores (1998) ao caracterizarem neoplasias mamárias de gatas sob o ponto de vista citológico, constataram que tais lesões apresentavam células com núcleos hipercromáticos e presença de figuras de

mitose. Amorim e co-autores (2006), além de tais características, verificaram que no tecido neoplásico foram encontradas células e núcleos com variação marcante de tamanho, presença de nucléolo e pleomorfismo celular.

## **CONCLUSÃO**

A maioria dos neoplasmas felinos apresenta característica de malignidade (carcinomas sólidos ou túbulo-papilares) e o tipo tumoral benigno mais frequente é o fibroadenoma. Histologicamente os tumores malignos são multifocais, padrão de crescimento predominantemente invasivo, com presença de necrose, figuras de mitose, infiltrado inflamatório e gradação histológica (HII e HIII) e citológica (C1 e C2) alta. Tais características propiciam um mau prognóstico para os indivíduos portadores e conseqüentemente, resultar em um menor tempo de vida pós-cirúrgico aos animais acometidos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos a Sra. Vera Lúcia Farias Cavalcanti, Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pelo suporte técnico realizado.

## **REFERÊNCIAS**

AMORIM, F.V.; SOUZA, H.J.M.; FERREIRA, A.M.R et al. Clinical, cytological and histopathological evaluation of mammary masses in cats from Rio de Janeiro, Brazil. *J. Feline Med. Surg.*, v. 8, p. 378-388, 2006.

CASTAGNARO, M.; DE MARIA, R.; BOZZETA, E. et al. Ki-67 index as indicator of the post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. *Res. Vet. Sci.*, v. 65, p. 223-226, 1998.

DE VICO, G.; MAIOLINO, P. Prognostic value of nuclear morphometry in feline mammary carcinomas. *J. Comp. Pathol.*, v. 117, p. 99-105, 1997.

ELLIS, I. O.; SCHMITT, S.J.; SASTRE-GARAU, X. et al. Invasive breast carcinoma. In: TAVASSOLI, F.A.; DEVILLE, P. (Eds.). *Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs*. World Health Organization Classification of Tumours. Lyon: IARC Press, 2003. p. 13-59.

GIMÉNEZ, F.; HECHT, S.; CRAIG, L.E. et al. Early detection, aggressive therapy: optimizing the management of feline mammary masses. *J. Feline Med. Surg.*, v. 12, p. 214-224, 2010.

ITO, T.; KADOSAWA, T.; MOCHIZUKI, M. et al. Prognosis of malignant mammary tumor in 53 cats. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 58, n. 8, p. 723-726, 1996.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. *Patologia veterinária*. 6. ed. São Paulo: Manole, 2000. 1415p.

KARAYANNOPOULOU, M.; KALDRYMIDOU, E.; CONSTANTINIDIS, T.C. et al. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. *J. Comp. Pathol.*, v. 133, p. 246-252, 2005.

KLOPJLEISCH, R.; SHÜTZE, M.; GRUBER, A.D. Loss of p27 expression in canine mammary tumors and their metástases. *Res. Vet. Sci.*, v. 88, n. 2, 2010.

MAGALHÃES, M.; OLIVEIRA, F.S.; HAKATA, A. et al. Neoplasmas mamários em gatas – revisão de literatura. *Rev. Clin. Vet.*, v. 79, p. 48-52, 2009.

MILLANTA, F.; LAZZERI, G.; MAZZEI, M. et al. MIB-1 labeling index in feline dysplastic and neoplastic mammary lesions and its relationship with postsurgical prognosis. *Vet. Pathol.*, v. 36, p. 619-636, 2002.

MISDORP, W.; ELSE, R.W.; HELLMAN, E. et al. *Histological classification of the mammary tumors of the dog and the cat* - World Health Organization International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals. 2.ed. Washington, D.C: Armed Force Institute of Pathology, 1999. 57p.

MORRIS, J.; DOBSON, J. *Oncologia em pequenos animais*. 5. ed. São Paulo: Roca, 2007. 312p.

MOULTON, J. E. Tumors of the mammary gland. In: \_\_\_\_\_. *Tumors in domestic animals*. 3. ed. Berkley: University of California Press, 1990. p. 547-552.

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. *Fundamentos de medicina interna de pequenos animais*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 2996p.

PINTO, R. M. M. O. *Neoplasias mamárias de cadelas e gatas*. 2009. 99f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

ROSEN, P.P.; OBERMAN, H.A. Tumor of the mammary gland. In: \_\_\_\_\_. *Atlas of tumor pathology*. 3. ed. Washington, D.C.: Armed Forces Institute of Pathology, 1993. p. 78-87.

SEIXAS, F.; PALMEIRA, C.; PIRES, M.A. et al. Grade is an independent prognostic factor for feline mammary carcinomas: A clinicopathological and survival analysis. *Vet. J.*, v. 187, n.1, p. 65-71, 2011.

SEIXAS, F.; PALMEIRA, C.; PIRES, M.A. et al. Are complex carcinoma of the feline mammary gland and other invasive mammary carcinoma identical tumours? Comparison of clinicopathologic features, DNA ploidy and follow up. *Res. Vet. Sci.*, v. 84, p. 428-433, 2008.

SEIXAS, F.; PALMEIRA, C.; PIRES, M.A. et al. Mammary invasive micropapillary carcinoma in cats; clinicopathologic features and nuclear DNA content. *Vet. Pathol.*, v. 44, p. 842-848, 2007.

SIMEONOV, R.; SIMEONOVA, G. Nuclear cytomorphometry in feline mammary gland epithelial tumours. *Vet. J.*, v. 179, p. 296-300, 2009.

Tab.1: Distribuição das lesões mamárias espontâneas de gatas (*Felis catus*) oriundas da casuística do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (HV, DMV, UFRPE) no período de 2008 a 2010.

<b>Classificação</b>	<b>Percentual (%)</b>
<i>Lesões Benignas</i>	
Adenoma simples	2,86% (1/35)
Adenose	2,86% (1/35)
Fibroadenoma	8,57% (3/35)
<i>Tumores Malignos</i>	
Carcinoma cribriforme	2,86% (1/35)
Carcinoma em tumor benigno (adenoma complexo)	2,86% (1/35)
Carcinoma mucinoso	2,86% (1/35)
Carcinoma sólido	51,43% (18/35)
Carcinoma sólido com áreas túbulo-papilares	8,57% (3/35)
Carcinoma túbulo-papilar	14,29% (5/35)
Carcinoma túbulo-papilar com áreas sólidas	2,86% (1/35)

Tab. 2: Distribuição dos parâmetros histopatológicos das lesões mamárias espontâneas de gatas (*Felis catus*) oriundas da casuística do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (HV, DMV, UFRPE) no período de 2008 a 2010.

	<b>Lesões benignas</b>	<b>Carcinomas</b>
No. de casos	5	30
<i>Necrose, n (%)</i>		
Ausente	3 (60)	4 (13,13)
+	2 (40)	6 (20)
++	0 (0)	5 (16,67)
+++	0 (0)	5 (16,67)
++++	0 (0)	10 (33,33)
<i>Infiltrado inflamatório, n (%)</i>		
Ausente	0 (0)	0 (0)
+	0 (0)	13 (43,33)
++	0 (0)	10 (33,33)
+++	0 (0)	7 (23,33)
<i>Invasão glandular, n (%)</i>		
Presente	NA	14 (46,67)
Ausente	NA	16 (53,33)

**Necrose** – (+): < 10%; (++): 10- 30%; (+++): 30-50%; (++++): > 50%.

**Infiltrado Inflamatório** – (+): Leve; (++): Moderado; (+++): intenso.

NA – Não aplicável



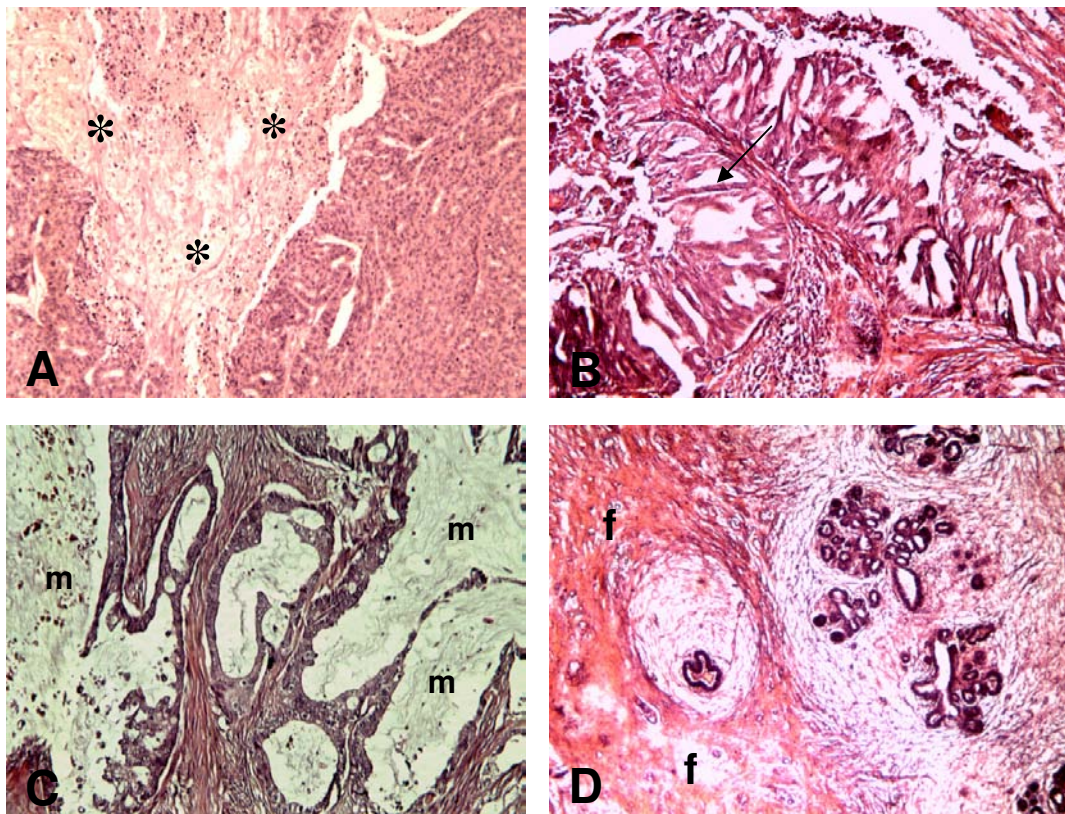


Fig. 01: Apresentação histopatológica dos tipos tumorais dos neoplasmas mamários espontâneas de gatas (*Felis catus*) oriundas da casuística do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (HV, DMV, UFRPE) no período de 2008 a 2010. Hematoxilina-Eosina (HE). **A** (100X) Carcinoma sólido apresentando extensa área de necrose e atipia celular; **B** (100X) Carcinoma túbulo-papilar; **C** (100X) Carcinoma mucinoso; **D** (100X) Fibroadenoma mamário. \* - áreas de necrose; → - apresentação papilar; m – depósito de muco (glicosaminoglicanos); f – tecido fibroso.

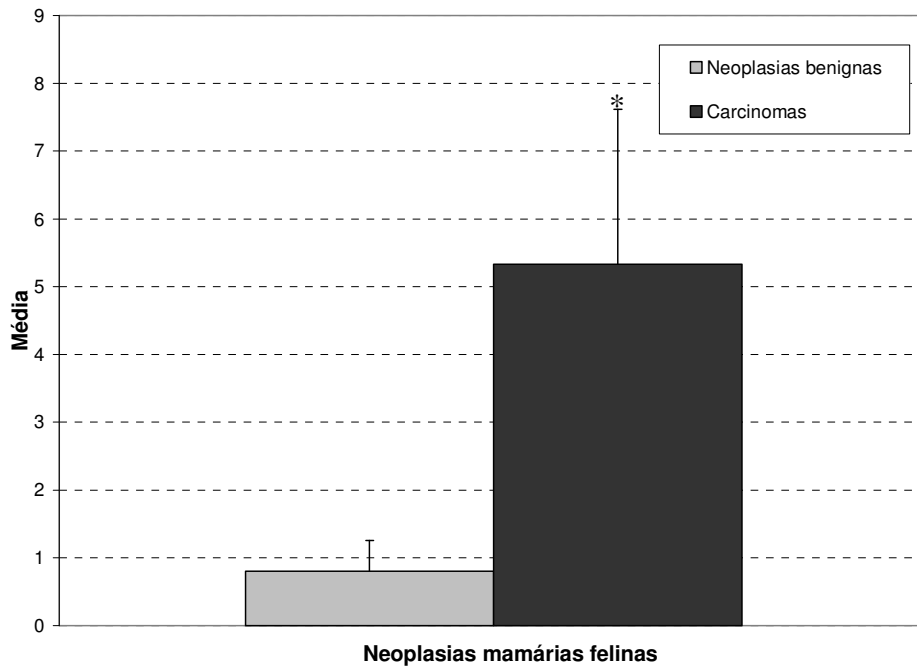


Fig. 2: Número médio de figuras de mitose encontradas em lesões mamárias benignas e carcinomas mamários de gatas (*Felis catus*) oriundas da casuística do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (HV, DMV, UFRPE) no período de 2008 a 2010.

\* $P = 0,006$ .

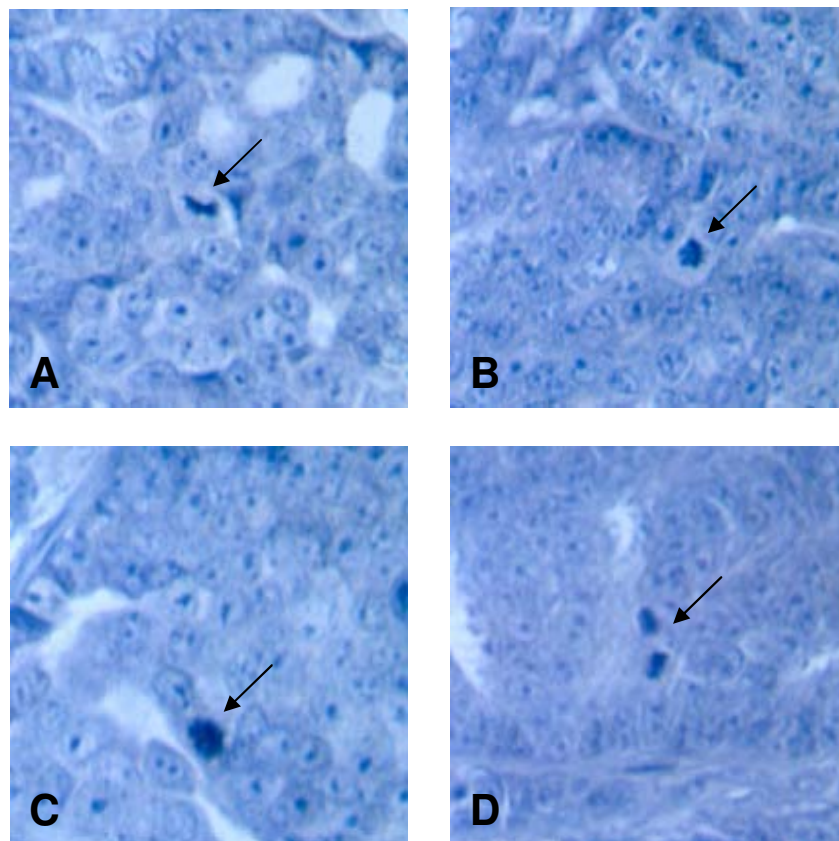


Fig. 3: Presença de figuras de mitose em carcinomas mamários de gatas (*Felis catus*) em diversas fases do ciclo celular. Hematoxilina de Harris. **A** (400X) Metáfase; **B** (400X) Prófase; **C** (400X) Interfase; **D** (400X) Telófase. → - figura de mitose.

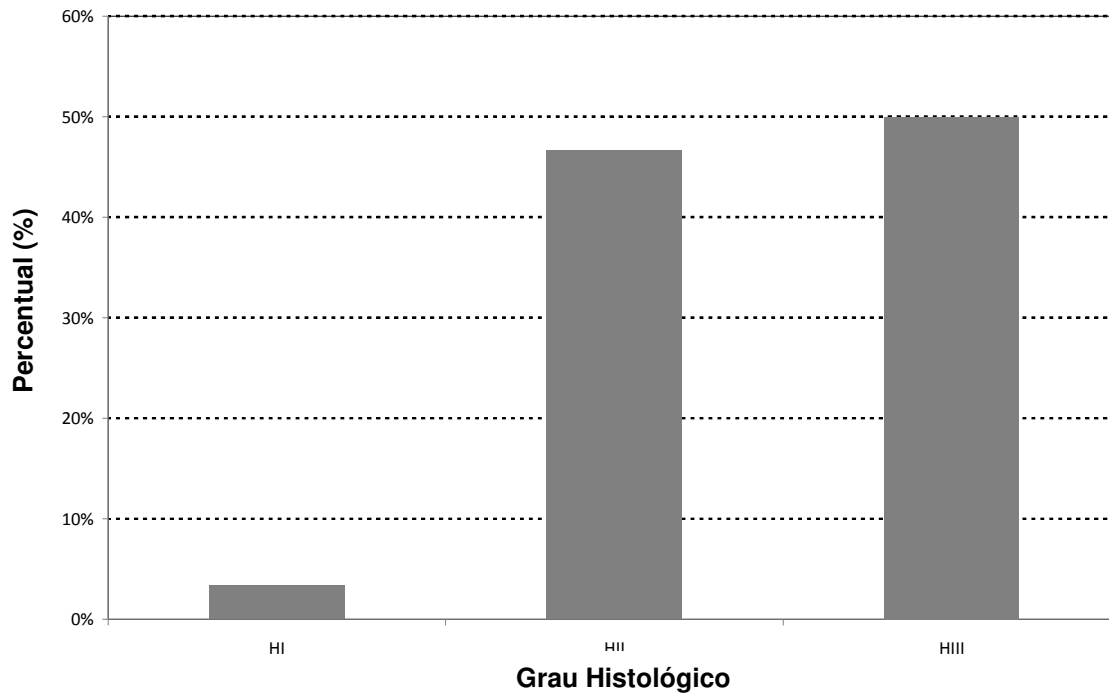


Fig. 4: Distribuição do grau histológico dos carcinomas mamários de gatas (*Felis catus*) oriundas da casuística do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (HV, DMV, UFRPE) no período de 2008 a 2010.

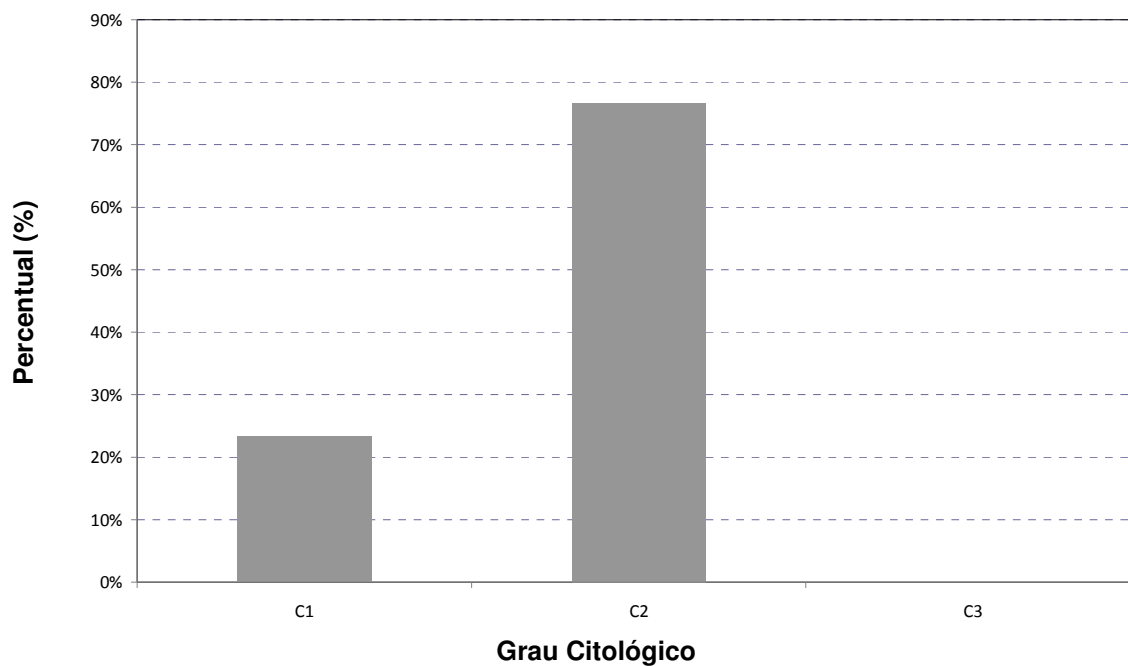


Fig. 5: Distribuição do grau citológico dos carcinomas mamários de gatas (*Felis catus*) oriundas da casuística do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (HV, DMV, UFRPE) no período de 2008 a 2010.

## 4.2. Perfil histoquímico e antigênico de neoplasmas mamários em felinos

[*Histochemical and antigenic profile of mammary neoplasms in cats*]

G.V. Schirato<sup>1,2</sup>, V.R. Silva<sup>3</sup>, R.C. Menezes<sup>4</sup>, E.L. Ribeiro<sup>5</sup>, C.A. Peixoto<sup>5</sup>, C.O. Neves<sup>6</sup>, M.R. Melo-Júnior<sup>6</sup> e A.L.F. Porto<sup>7\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil.

<sup>2</sup>Biotério Experimental, Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Brasil.

<sup>3</sup>Hospital Veterinário, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil.

<sup>4</sup>Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses, Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Brasil.

<sup>5</sup>Laboratório de Ultra-estrutura, Departamento de Entomologia, Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Brasil.

<sup>6</sup>Departamento de Patologia, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

<sup>7</sup>Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil.

\*Autor para correspondência: Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos. Recife, PE – Brasil. CEP: 52171-900. Telefone: +55 81 33206391, Fax: +55 81 21268485. E-mail: [analuporto@yahoo.com.br](mailto:analuporto@yahoo.com.br).

### RESUMO

Os tumores mamários em felinos são mais comuns em fêmeas idosas (média 11 anos) e não castradas. Histologicamente, a maioria dos tumores mamários felinos são adenocarcinomas,

com padrão papilar ou tubular e sólido. Objetivou-se com esse estudo, caracterizar sob o ponto de vista histoquímico e antigênico, neoplasias mamárias de ocorrência espontânea em gatas. Trinta e cinco amostras de tecido neoplásico foram coletadas cirurgicamente e os cortes histológicos foram corados pelo Tricromico de Masson e Ácido Periódico de Schiff (PAS), para avaliar os depósitos de colágeno e glicosaminoglicanos associados aos tumores, respectivamente. Para realização dos ensaios imunoistoquímicos foram utilizados os anticorpos anti-Ki-67, anti-PCNA e anti-Bcl-2. A maioria das lesões mamárias de gatas foram carcinomas e tais tumores apresentaram padrão de coloração moderada a forte quando coradas com PAS e fraca a moderada com Tricrômico de Masson. A marcação do Ki-67 apresentou distribuição de padrão citoplasmático e nuclear em células malignas bem diferenciadas no tecido neoplásico. A proteína Bcl-2 apresentou distribuição de padrão membranar restrito ao tecido transformado e o tecido marcado com o anticorpo anti-PCNA demonstrou distribuição de padrão citoplasmático e nuclear em células glandulares, ocasionalmente em células estromais de aspecto epitelióide. Em relação à marcação da PCNA, 100% dos adenocarcinomas apresentaram positividade e 60% das lesões benignas foram positivas. Entre as últimas, o adenoma simples apresentou marcação ao anticorpo anti-PCNA, como também 66,67% dos fibroadenomas. Em resumo, a grande quantidade de figuras de mitose e a maior reatividade à marcação com o anticorpo anti-PCNA sugere neoplasmas com intensa atividade proliferativa evidenciando um mau prognóstico para os indivíduos portadores.

**Palavras-chave:** Neoplasia mamária, *Felis catus*, Imunoisquímica, PAS, Colágeno.

## **ABSTRACT**

The mammary tumors in cats are more common in elderly females (mean 11 years) and intact. Histologically, the majority of feline mammary tumors are adenocarcinomas, with papillary or tubular pattern and solid. The aim of this study was to characterize the point of view

histochemical and antigenic spontaneously occurring mammary tumors in cats. Thirty-five samples of tumor tissue were collected surgically and histological sections were stained with Masson Trichrome and Periodic Acid Schiff (PAS) to evaluate the deposition of collagen and glycosaminoglicanos associated with tumors, respectively. To perform the immunohistochemistry assays were used anti-Ki-67, anti-PCNA and anti-Bcl-2. Most breast lesions in cats were carcinomas and these tumors showed staining pattern when moderate to strong staining with PAS and weak to moderate with Masson. The marking of Ki-67 showed the distribution pattern of cytoplasmic and nuclear in malignant cells in well-differentiated tumor tissue. The protein Bcl-2 showed membrane distribution pattern restricted to the processed tissue and the tissue marked with anti-PCNA distribution pattern showed cytoplasmic and nuclear glandular cells, occasionally in stromal cells of epithelioid appearance. Regarding the marking of PCNA, 100% of adenocarcinomas were positive and 60% of the benign lesions were positive. Among the latter, the simple adenoma showed labeling to anti-PCNA, as well as 66.67% of fibroadenomas. In summary, the large number of mitotic figures and increased reactivity to staining with anti-PCNA antibody suggests neoplasms with intense proliferative activity indicating a poor prognosis for affected individuals.

**Key words:** Mammary neoplasia, *Felis catus*, Immunohistochemistry, PAS, Collagen.

## INTRODUÇÃO

A ocorrência de neoplasias é um problema comum na prática da medicina veterinária de pequenos animais. Com a melhoria de práticas e investigações, doenças de cães e gatos são cada vez mais diagnosticadas. Embora os dados sobre a incidência de tumores desses animais ainda sejam escassos, estimativas sugerem que um entre dez indivíduos irá desenvolver neoplasias durante seu período natural de vida. Os tumores mamários são comuns em



pequenos animais. Ampla variedade de tipos histológicos ocorre em cães, embora de maioria benigna. Em gatos, a maioria dos tumores é maligna e muito agressiva (Morris e Dobson, 2007).

Com exceção dos tumores de pele e do tecido linfo-hematopoiético, os tumores de mamários são os mais comuns em felinos domésticos. A grande maioria dos tumores mamários nesta espécie é maligna com porcentagem variando de 85 a 90%. Dessa forma, essa doença é apontada como uma das principais causas de morte de gatas de meia-idade e idosas (Magalhães et al., 2009).

Existem atualmente diversas técnicas diagnósticas que auxiliam no tratamento das neoplasias, dentre elas pode-se destacar a imunoistoquímica (IQ) de biópsias teciduais, método este de grande auxílio na discriminação de tumores assemelhados e, muitas vezes, de difícil interpretação pelos métodos histológicos de rotina (Novellino et al., 2003).

A imunoistoquímica teve grande desenvolvimento a partir da década de 1970, quando foi possível demonstrar antígenos teciduais pela técnica de imunoperoxidase em tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina. Atualmente, a IQ está incorporada à patologia cirúrgica como método diagnóstico complementar. O desenvolvimento de anticorpos monoclonais gera enorme fonte de reagentes altamente específicos para a demonstração de vários antígenos teciduais e celulares, e o advento da recuperação antigênica foi um fato marcante na evolução da técnica (Werner et al., 2005).

O estudo imunoistoquímico tem sido utilizado em diferentes situações da patologia mamária, sendo as mais importantes: avaliação de fatores preditivos e prognósticos do câncer de mama, pesquisa de células epiteliais metastáticas em linfonodo sentinela, diagnóstico diferencial de lesões mamárias e determinação de possível origem de neoplasias metastáticas (Salles et al., 2009).

O índice de proliferação, determinado por marcadores do ciclo celular, tais como a proteína Ki-67 e o antígeno de proliferação nuclear (PCNA), tem valor prognóstico para carcinomas mamários de felinos (Peña et al., 1998). O PCNA, também conhecido como ciclina ou DNA-polimerase, é uma proteína muito expressada em células em proliferação e atinge uma concentração máxima nas fases G1/S do ciclo celular e depois diminui nas fases G2/M. Em seres humanos e animais, a marcação IQ com o anticorpo anti-PCNA é uma potencial ferramenta para o estudo da atividade proliferativa de tecidos, e pode ser realizada em espécimes fixados em formalina (Preziosi et al., 1995; Ihan et al., 2008).

O marcador de proliferação Ki-67 é expresso em todas as fases do ciclo celular (Ladstein et al., 2010). A coloração pela marcação com anticorpo anti-Ki-67 ou específico é moderada a forte, de padrão nuclear e demonstra-se difusa, granular e/ou nucleolar. As figuras de mitose estão sempre bem coradas (Castagnaro et al., 1998).

O crescimento tumoral é um aumento localizado no número de células, em resultado ao aumento da atividade proliferativa e diminuição da apoptose e da necrose. O Bcl-2 e o *bax* são dois membros distintos de uma família de genes que desempenham papel na regulação da apoptose. Estes dois genes possuem partes homólogas em uma sequência parcial de nucleotídeos. Entretanto, seus produtos individuais parecem ter funções distintas: Bcl-2 é um fator supressor da apoptose, enquanto *bax* é considerado um promotor de apoptose (Madewell et al., 2001). A distribuição do Bcl-2 ocorre em diversos tecidos, realizando o papel na prevenção da morte celular programada. Em um estudo utilizando 200 tumores felinos de vários tipos histológicos, a proteína Bcl-2 foi mais difundida em adenomas de tireóide, carcinomas de mama e em linfomas. Na pele, Bcl-2 foi expresso em todos os tumores basocelulares, mas em nenhum carcinoma de células escamosas (Madewell et al., 1999; Madewell et al., 2001).

Objetivou-se com esse estudo, caracterizar o perfil de neoplasias mamárias de ocorrência espontânea em gatas sob o ponto de vista histoquímico, para a avaliação dos depósitos de colágeno e glicosaminoglicanos e antigênico, utilizando técnicas imunoistoquímicas com os anticorpos anti-Ki-67, anti-Bcl-2 e anti-PCNA.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

As amostras de tecido neoplásico mamário de gatas foram obtidas por ressecção cirúrgica (mastectomia simples ou dissecação em bloco) de animais oriundos da casuística do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (HV, DMV, UFRPE) no período de 2008 a 2010. Os 35 tumores coletados foram fixados em formalina 10% preparada em tampão PBS 7,2 e posteriormente, as amostras foram submetidas ao processamento histológico de rotina e incluídas em parafina. Após microtomia, os cortes (4µm) foram corados pelo Tricrômico de Masson e Ácido Periódico de Schiff (PAS) (Michalany, 1990), para estudo histoquímico.

Para realização da técnica imunoistoquímica, os blocos parafinados relativos aos casos em estudo, foram obtidos cortes histológicos com espessura média de 5µm. Posteriormente, foram estendidos em lâminas previamente lavadas em solução sulfocrômica, emulsionadas com adesivo à base de poli-L-lisina (Poly-L-Lysine, da marca Sigma, USA, P8920) a 10% e colocadas em estufa a 60°C durante 12 horas para melhor aderência desses às lâminas.

Depois de identificadas por cada marcação, as lâminas com os cortes histológicos voltaram à estufa a 60°C por 20 minutos e, em seguida, foram colocadas em três banhos de xilol (2 minutos cada) e em 3 banhos de álcool em concentrações decrescentes de 95%, 70% 50% (2 minutos cada), conforme procedimento histotécnico usual, em temperatura ambiente.

Os cortes histológicos para marcação com o anticorpo anti-Ki-67 (MIB-1) (diluição 1:50, marca DAKO, M 7240), anticorpo anti-PCNA (diluição 1:250, marca DAKO, M0879) e

anticorpo anti-Bcl-2 (diluição 1:250, marca DAKO, M 0887) foram mergulhados em tampão citrato de sódio com pH 6,0 em banho-maria a 95°C por 40 minutos. Foram retirados do banho-maria e ficaram em descanso por 20 minutos na bancada. Após estas etapas, foram lavados em água destilada.

Em seguida, a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada através da imersão em peróxido de hidrogênio a 3% em metanol a 70% durante 20 minutos. Após esta etapa, foram lavados em água destilada e colocados em tampão PBS pH 7,4 com TWIN 20 (marca Sigma, P7949), em 3 banhos de 1 minutos cada.

Em seguida, os cortes histológicos foram circulados com uma caneta com tinta hidrofóbica (marca Dako, S2002) para evitar que a solução com o anticorpo diluído escorresse e aplicados os anticorpos previamente diluídos em uma solução de PBS-TWIN20+BSA a 0,1%, para bloquear as proteínas inespecíficas. Após 40 minutos de reação em temperatura ambiente, foi aplicado o kit da Dako Advance (cód. K4068), sendo ao fim de cada etapa lavados em tampão PBS-TWIN20.

Foi adicionado o cromógeno DAB (Dako-K3466) por 30 segundos a 1 minuto em média. Em seguida, os cortes histológicos foram lavados em água destilada e contracorados em hematoxilina de Harris, azuladas em água corrente, desidratadas em álcool com concentrações crescentes 50%, 70%, 90% e P.A., e depois quatro banhos de xilol e finalmente montadas com goma de Damar (marca Proquímios) para fixação das lamínulas.

Os cortes histológicos corados com Tricromico de Masson, PAS e com a marcação imunoistoquímica foram analisados em microscopia de luz. A classificação tumoral foi realizada de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) (Misdorp et al., 1999), onde foram considerados os aspectos histopatológicos mais pronunciados.

Para realização dos estudos morfométricos, as imagens dos cortes histológicos foram captadas por uma câmara de vídeo digital (Sony™-EUA) conectada a um microscópio e

foram digitalizados com o programa de análise de imagem MOTIC™ (China). Os padrões de coloração do colágeno foram utilizados para calcular a área média de deposição de colágeno intersticial (área total de 12,234  $\mu\text{m}^2$ ) e a média do número de células PAS+ (marcação fraca = 15-20%, marcação moderada = 25-55%; marcação intensa = 60 - 95%). As análises ópticas semi-quantitativas foram realizadas levando em consideração a intensidade do padrão de coloração, indicada como: fraca (+), moderada (++) ou intensa (+++) – de acordo com Özer et al. (2000).

Os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão ( $M \pm dp$ ), submetidos ao teste Tukey, através do software PRISM 3.0, aceitando como estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de 5%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre as 35 lesões mamárias, verificou-se que 85,71% destas eram carcinomas e 14,29% tratava-se de lesões benignas (Tab. 1). As lesões mais frequentes, dentro das amostras estudadas, eram carcinomas sólidos (51,43%) e o carcinoma túbulo-papilar (14,29%). Entre as lesões benignas, o fibroadenoma foi encontrado em maior frequência (8,57% do total das lesões mamárias).

Figuras de mitose também foram visualizadas em maior quantidade nos carcinomas quando comparadas às lesões benignas ( $P=0,006$ ). Os tipos tumorais que apresentam maior número de mitoses por campo (400X) foram: carcinoma sólido ( $5,5 \pm 2,21$ ), carcinoma sólido com áreas túbulo-papilares ( $5,5 \pm 2,12$ ) e o carcinoma túbulo papilar ( $5,2 \pm 1,94$ ).

As análises histoquímicas, utilizando a coloração pelo Ácido Periódico de Schiff (PAS) (Tab. 2), revelaram que o carcinoma mucinoso apresentou grande quantidade de mucopolissacarídeos no tecido tumoral, classificando-se como de padrão de coloração intenso. Os carcinomas ductais e os fibroadenomas apresentaram padrão de coloração

moderado com PAS. As lesões benignas classificadas como adenoma/adenose apresentaram reação fraca à coloração, enquanto os carcinomas papilares e o tecido normal da glândula mamária da gata, não apresentaram positividade (Fig. 1).

Em relação à presença de colágeno intersticial, revelada pela coloração com Tricrômico de Masson, foi possível observar que os fibroadenomas apresentaram, entre todos os tumores mamários estudados, maior quantidade de colágeno no tecido neoplásico (Fig. 2). O carcinoma mucinoso apresentou padrão de coloração de intensidade moderada. Os carcinomas ductais e o tecido mamário normal apresentaram baixa quantidade de colágeno e foram classificados como de padrão de marcação fraco. Por outro lado, os carcinomas papilares e a adenose/adenoma não apresentaram marcação significativa da proteína em questão.

As lesões mamárias também foram submetidas a reações imunoistoquímicas com a marcação dos anticorpos anti-PCNA, anti-Ki-67 e anti-Bcl-2 (Tab. 3). A marcação para revelar o Ki-67 apresentou padrão citoplasmático e nuclear em células malignas bem diferenciadas no tecido neoplásico. Por outro lado, o antígeno Bcl-2 apresentou padrão membranar restrito ao tecido transformado, enquanto o tecido marcado com o anticorpo anti-PCNA, demonstrou padrão citoplasmático e nuclear em células glandulares e ocasionalmente em células estromais de aspecto epitelióide.

Em relação à marcação com anticorpo anti-PCNA (Fig. 3), 100% dos adenocarcinomas e 60% das lesões benignas apresentaram marcação positiva. Nas últimas, o adenoma simples apresentou marcação pelo anticorpo, assim como 66,67% dos fibroadenomas.

Apenas 20% dos tumores benignos foram marcados pelo anticorpo anti-Ki-67, enquanto 53,33% dos carcinomas apresentaram positividade. Entre as lesões benignas, 33,33% (1/3) dos fibroadenomas apresentaram-se positivos. Os tipos tumorais malignos que

apresentaram imunoreatividade ao anticorpo anti-Ki-67 foram: carcinoma mucinoso (100%), carcinoma sólido (61,11%), carcinoma sólido com áreas túbulo-papilares (33,33%) e carcinoma túbulo-papilar (33,33%).

Nenhuma lesão benigna apresentou-se positiva para a marcação com o anticorpo anti-Bcl-2. Enquanto que entre os carcinomas positivos, observou-se a seguinte distribuição: carcinoma sólido (38,87%), carcinoma sólido com áreas túbulo-papilares (60%) e carcinoma túbulo-papilar (20%).

O diagnóstico de tumores mamários na espécie felina é comum. Há relatos que 80% a 96% das neoplasias da mama de gatas são carcinomas. Tais carcinomas são bastante infiltrativos e com grande capacidade de provocar metástases (Seixas et al., 2011).

Na medicina humana, carcinoma mucinoso foi definido como um tumor, contendo grandes quantidades de muco extracelular, suficientes para serem facilmente visíveis e reconhecíveis microscopicamente (WHO, 1981).

Corroborando com os resultados do presente trabalho, Sarli e co-autores (2006), verificaram que o carcinoma mucinoso é caracterizado pela produção abundante de mucina e são raros em felinos. Esses tumores podem ser simples ou complexos e possuem material mucinoso que é marcado positivamente pelo Ácido Periódico de Schiff (PAS).

O colágeno tipo I é um componente predominante da matriz extracelular estromal. Sua expressão ocorre na formação ductal mamária, indicando que tal proteína desempenha papel importante no desenvolvimento do tecido (Provenzano et al., 2006). Félix e co-autores (1999) relataram que a laminina e o colágeno IV estão envolvidos no processo de transformação de adenomas pleomórficos em neoplasias malignas – sugerindo que a presença de grande quantidade de colágeno intersticial nas neoplasias representa um mau prognóstico aos pacientes.

Melo-Junior e colaboradores (2008) ao realizarem análise histopatológica em neoplasias mamárias em mulheres, verificaram uma maior distribuição do colágeno intersticial em fibroadenomas e na doença fibrocística, quando comparados ao tecido mamário normal e ao carcinoma ductal infiltrante.

Souza e colaboradores (2002) ao realizarem estudos histopatológicos em fibroadenomas mamários de gatas, verificaram que o crescimento da neoplasia foi caracterizado pela proliferação acentuada dos ductos intralobulares cercada por extensa proliferação de tecido conjuntivo. Essas características histológicas também foram encontradas no presente trabalho, uma vez que os fibroadenomas mamários foram os que apresentaram maior intensidade de coloração pelo Tricrômico de Masson, entre as neoplasias estudadas.

As técnicas imunoistoquímicas são uma ferramenta poderosa ao dispor do diagnóstico anatomo-patológico e da investigação. Não obstante, a imunoistoquímica é um meio de se obter o diagnóstico e frequentemente serve de complemento para o raciocínio diagnóstico, sem substituí-lo. O prognóstico e a indicação terapêutica são muito condicionados pelos recursos dessas técnicas. De um modo geral, os antígenos que podem ser expressos pelas diferentes patologias já são conhecidos e estudados, sendo necessário, muitas vezes, detectar sua existência para confirmar a patologia correspondente (Ferro, 2007).

Em um estudo realizado por Preziosi e colaboradores (Preziosi et al., 1995), foi observado que células neoplásicas mamárias malignas e benignas de cadelas e gatas são marcadas pelo anticorpo anti-PCNA. No entanto, tal índice é significativamente maior em neoplasias malignas. Em nossos estudos, foi observado que as lesões tumorais apresentaram comportamento semelhante, uma vez que 60% e 100% das neoplasias benignas e malignas, respectivamente, foram marcadas pelo anticorpo.



Os mesmos autores também observaram, no mesmo estudo, que o índice mitótico nas neoplasias de cadelas foi maior em neoplasias malignas. Entretanto, o mesmo comportamento não foi observado nos tumores mamários das gatas – não observando diferença em relação ao índice mitótico das neoplasias de característica maligna e benigna. O autor atribuiu esta observação ao fato de que nos felinos domésticos, a hipertrofia mamária benigna /fibroadenoma complexo não é um verdadeiro crescimento neoplásico, mas uma forma de hiperplasia. Porém, nossos resultados apontaram que o número de mitoses por campo foi maior em neoplasias malignas que em lesões benignas.

A reação imunoistoquímica para detecção do antígeno Ki-67 confere uma marcação nuclear moderada a forte, com distribuição difusa, granular, nucleolar ou a mistura de um ou mais padrões (Castagnaro et al., 1998). Segundo Castagnaro e colaboradores (1998), fatores como idade e tipo histológico das neoplasias mamárias das gatas não foram significativamente relacionados com Ki-67, como também para o tempo de sobrevivência do animal.

Peña et al. (1998), ao estudar neoplasias mamárias de cadelas, verificaram que a expressão da PCNA é mais intensa que a Ki-67 já que possui uma meia-vida longa e sua expressão persiste após o final da mitose. Em nossos estudos, verificamos que todos os carcinomas mamários foram marcados com o anticorpo anti-PCNA e 53,33% apresentaram positividade para a Ki-67.

A inibição da apoptose pode ocorrer em qualquer fase do ciclo celular, embora o mecanismo exato pelo qual Bcl-2 inibe a apoptose não seja totalmente compreendido. Quando há superexpressão de Bcl-2, a capacidade da célula para remover o dano genético e celular através da apoptose é limitado. Apesar do fato que Bcl-2 não ser relacionado diretamente à proliferação celular, a superexpressão permite que os tumores em estágio de progressão e com

fenótipos altamente malignos tornem-se ainda mais resistentes a tratamento anti-neoplásicos (Espíndola e Corleta, 2008).

Em estudos realizados por Madewell et al.(1999), os autores verificaram que treze dos quinze (86,67%) carcinomas mamários de gatas foram imunorreativos para Bcl-2. O percentual de células tumorais reativas variou entre 20% a 80% (média de 59%). Em nosso estudo, apenas 30% das amostras de carcinomas mamários foram imunorreativas ao Bcl-2, enquanto nenhuma neoplasia benigna apresentou positividade para a marcação com o anticorpo.

## **CONCLUSÃO**

A maioria das lesões mamárias felinos apresenta característica de malignidade, ocorrendo aumento na distribuição de colágeno intersticial e células PAS+ em carcinoma mucinoso e fibroadenomas. As neoplasias malignas apresentam maior reatividade decrescente à marcação com o anticorpo PCNA, seguido por Ki-67 e Bcl-2. Nos tumores benignos há marcação tecidual apenas para PCNA e Ki-67. Os dados sugerem que os neoplasmas malignos em felinos têm intensa atividade proliferativa evidenciando um mau prognóstico e consequentemente, pode resultar em um menor tempo de sobrevivência pós-cirúrgico aos animais acometidos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos a Sra. Vera Lúcia Farias Cavalcanti, Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pelo suporte técnico realizado.

**REFERÊNCIAS**

- CASTAGNARO, M.; DE MARIA, R.; BOZZETA, E. et al. Ki-67 index as indicator of the post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. *Res. Vet. Sci.*, v. 65, p. 223-226, 1998.
- ESPÍNDOLA, M.B.; CORLETA, O.C. Bcl-2 expression is not associated with survival in metastatic cutaneous melanoma: a historical cohort study. *World J. Surg. Oncol.* v. 6, p. 65-70, 2008.
- FÉLIX, A.; ROSA, J.C.; FONSECA, I. et al. Laminin and collagen IV in pleomorphic adenoma and carcinoma ex-pleomorphic adenoma: an immunohistochemical study. *Hum. Pathol.*, v. 30, n.8, p. 964-969, 1999.
- FERRO, A.J.B. *Técnicas Imunocitoquímicas*. Lisboa: Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, 2007. 101 p.
- IHAN, F.; METIN, N.; BIRINCIÖGLU, S.T. Immunohistochemical detection of PCNA and p53 in mammary tumours and normal tissues in dogs. *Revue Méd. Vét.*, v. 159, p. 298-304 2008.
- LADSTEIN, R.G.; BACHMANN, I.M.; STRAUME, O. et al. Ki-67 expression is superior to mitotic count and novel proliferation markers PHH3, MCM4 and mitotin as prognostic factor in thick cutaneous melanoma. *BMC Cancer*, v. 10, p.140-155, 2010.
- MADEWELL, B.R.; GANDOUR-EDWARDS, R.; EDWARD, B.F. et al. Bax/Bcl-2: cellular modulation of apoptosis in feline skin and basal cell tumours. *J. Comp. Pathol.*, v. 124, p. 115-151, 2001.

MADEWELL, B.R.; GANDOUR-EDWARDS, R.; EDWARDS, B.F. et al. Topographic distribution of Bcl-2 protein in feline tissues in health and neoplasia. *Vet. Pathol.*, v. 36, p. 565-573, 1999.

MAGALHÃES, M.; OLIVEIRA, F.S.; HAKATA, A. et al. Neoplasmas mamários em gatas – revisão de literatura. *Rev. Clin. Vet.*, v. 79, p. 48-52, 2009.

MELO-JÚNIOR, M.R.; MACHADO, M.C.F.P.; ARAÚJP-FILHO, J.L.S. et al. Análise morfológica de micronúcleos e colágeno intersticial em tumores de mama. *Rev. Ciênc. Med. Biol.*, v.7, n. 1, p. 49-56, 2008.

MICHALANY, J. *Técnica histológica em anatomia patológica*. 2.ed. São Paulo: Michalany, 1990. 277p.

MISDORP, W.; ELSE, R.W.; HELLMAN, E. et al. *Histological classification of the mammary tumors of the dog and the cat* - World Health Organization International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals. 2.ed. Washington, D.C: Armed Force Institute of Pathology, 1999. 57p.

MORRIS, J.; DOBSON, J. *Oncologia em pequenos animais*. São Paulo: Roca, 2007. 300p.

NOVELLINO, A.T.N.; AMORIM, R.F.B.; QUEIROZ, L.M.G. Análise da imunoexpressão do PCNA e p53 em carcinoma de células escamosas orais: correlação com a gradação histológica de malignidade e características clínicas. *Acta Cir. Bras.*, v.18, p.458-464, 2003.

ÖZER, E.; SARIOGLU, S.; GÜRE A. Effects of prenatal ethanol exposure on neuronal migration, neurogenesis and brain myelination in the mice brain. *Clin. Neuropathol.*, v. 19, n.1, p.21-25, 2000.

PEÑA, L.L.; NIETO, A.I.; PÉREZ-ALENZA, D. et al. Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathological variables. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 10, p. 237-246 1998.

PREZIOSI, R.; SARLI, G.; BENAZZI, C. et al. Detection of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in canine and feline mammary tumours. *J. Comp. Path.*, v. 113, p. 301-313, 1995.

PREZIOZI, R.; SARLI, G.; BENAZZI, C. et al. Detection of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in canine and feline mammary tumours. *J. Comp. Path.*, v. 113, p. 301-313, 1995.

PROVENZANO, P.P.; ELICEIRI K.W.; CAMPBELL, J.M. et al. Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC Med.*, v. 4, n.36, p. 1-16, 2006.

SALLES, M.A.; CÚRCIO, V.S.; PEREZ, A.A. et al. Contribuição da imuno-histoquímica na avaliação de fatores prognósticos e preventivos do câncer de mama e no diagnóstico de lesões mamárias. *J. Bras. Med. Lab.*, v. 45, p. 213-222, 2009.

SARLI, G.; BRUNETTI, B.; BENAZZI, C. Mammary mucinous carcinoma in the cat. *Vet. Pathol.*, v. 43, p. 667-673, 2006.

SEIXAS, F.; PALMEIRA, C.; PIRES, M.A. et al. Grade is an independent prognostic factor for feline mammary carcinomas: A clinicopathological and survival analysis. *Vet. J.*, v. 187, n.1, p. 65-71, 2011.

SOUZA, T. M.; FIGHERA, R. A.; LANGOHR, I. et al. Hiperplasia fibroepitelial mamárias em felinos: cinco casos. *Cienc. Rural*, v. 32, n. 5, p. 891-894, 2002.

WERNER, B.; CAMPOS, A.C.; NADJI, M. et al. Uso prático da imuno-histoquímica em patologia cirúrgica. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, v. 41, p.353-364, 2005.

WHO. Histological Typing of Breast Tumors. In: \_\_\_\_\_. International Histological Classification of Tumors, 2.ed. Geneva: World Health Organization, 1981. p. 19.

Tab. 1: Número de figuras de mitose por campo (400X) e perfil de marcação imunoistoquímica para os marcadores PCNA, Ki-67 e Bcl-2 de lesões mamárias de gatas (*Felis catus*) oriundas da casuística do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (HV, DMV, UFRPE) no período de 2008 a 2010.

Classificação	Ocorrência (%)	Figuras de Mitose (Média ± desvio padrão)	Marcação Imunoistoquímica (%)		
			PCNA	Ki-67	Bcl-2
<b>Lesões Benignas</b>					
Adenoma simples	2,86% (1/35)	1	100% (1/1)	0% (0/1)	0% (0/1)
Adenose	2,86% (1/35)	1	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)
Fibroadenoma	8,57% (3/35)	0,67 ± 0,47	66,67% (2/3)	33,3% (1/3)	0% (0/3)
<b>Tumores Malignos</b>					
Carcinoma cribriforme	2,86% (1/35)	4	100% (1/1)	0% (0/1)	0% (0/1)
Carcinoma em tumor benigno (adenoma complexo)	2,86% (1/35)	3	100% (1/1)	0% (0/1)	0% (0/1)
Carcinoma mucinoso	2,86% (1/35)	4	100% (1/1)	100% (1/1)	0% (0/1)
Carcinoma sólido	51,43% (18/35)	5,5 ± 2,21	100 (18/18)	61,11% (11/18)	38,87% (7/18)
Carcinoma sólido com áreas túbulo-papilares	8,57% (3/35)	5,5 ± 2,12	100% (3/3)	33,33% (1/3)	33,33% (1/3)
Carcinoma túbulo-papilar	14,29% (5/35)	5,2 ± 1,94	100% (5/5)	60% (3/5)	20% (1/5)
Carcinoma túbulo-papilar com áreas sólidas	2,86% (1/35)	3	100% (1/1)	0% (0/1)	0% (0/1)

Tab. 2: Perfil histoquímico das lesões mamárias de gatas (*Felis catus*) oriundas da casuística do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (HV, DMV, UFRPE) no período de 2008 a 2010, utilizando a coloração Ácido Período de Schiff (PAS) e Tricrômico de Masson (para identificação de colágeno intersticial).

<b>Tipos Tumorais</b>	<b>Células PAS+</b>	<b>Colágeno intersticial</b>
Carcinoma ductal	++	+
Carcinoma mucinoso	+++	++
Carcinoma papilar	-	-
Adenomas	+	-
Fibroadenomas	++	+++
Tecido Normal	-	+

**Padrão de marcação** (+): Leve; (++) : Moderado; (+++) : Intenso



Tab. 2: Perfil imunoistoquímico com marcação dos anticorpos anti-PCNA, anti-Ki-67 e anti-Bcl-2 em lesões mamárias de gatas (*Felis catus*) oriundas da casuística do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (HV, DMV, UFRPE) no período de 2008 a 2010.

<b>Tipo Tumoral</b>	<b>Marcadores imunoistoquímicos</b>		
	<b>PCNA</b>	<b>Ki-67</b>	<b>Bcl-2</b>
Lesões benignas (n=5)	60% (3/5)*	20% (1/5)	0% (0/5)
Carcinomas (n=30)	100% (30/30)	53,33% (16/30)	30% (9/30)

\* % (número de casos positivos/ total de casos)

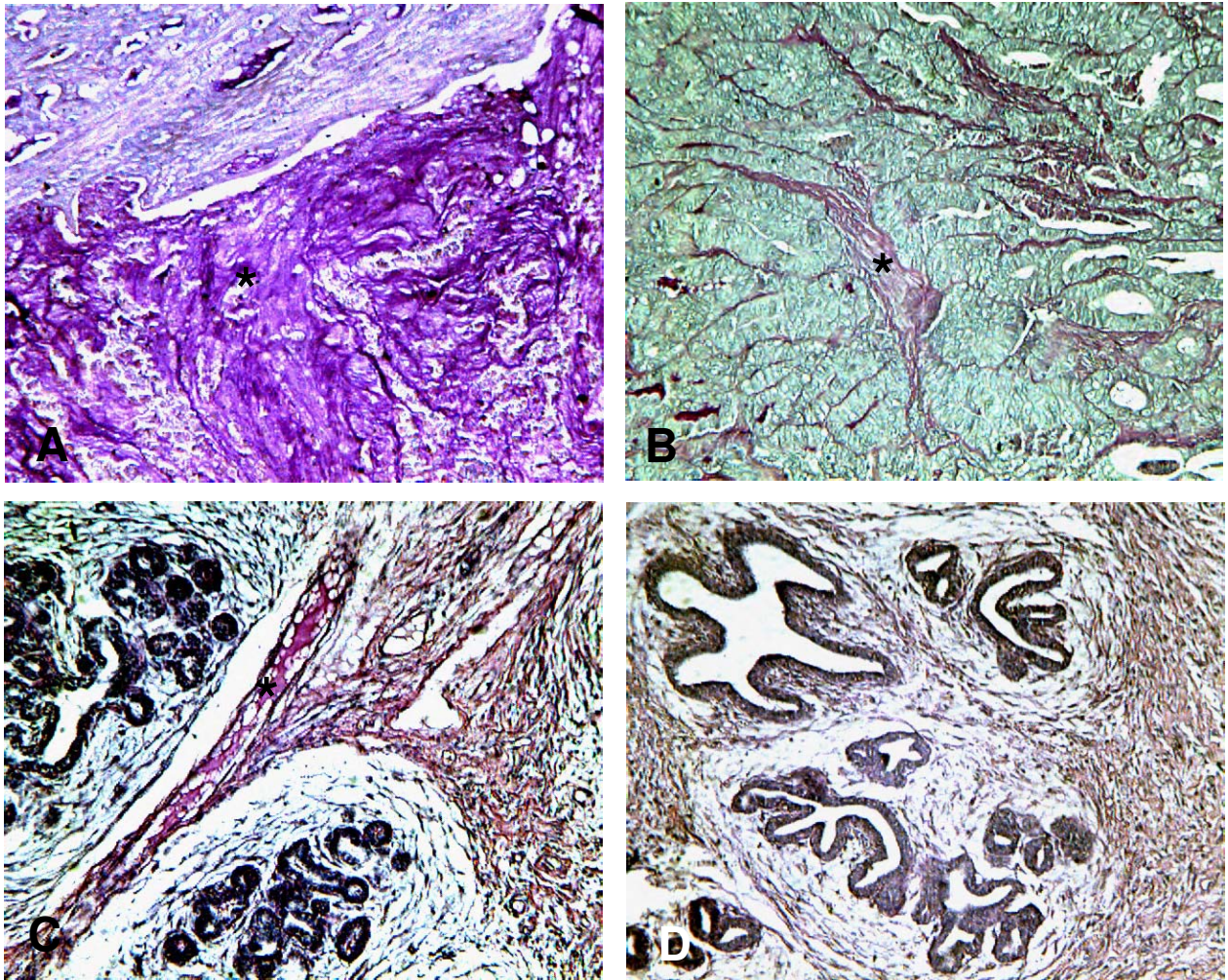


Fig. 01: Marcação histoquímica dos tecidos neoplásicos mamários de gatas (*Felis catus*) com o Ácido Periódico de Schiff (PAS). **A** (100X) Carcinoma mucinoso apresentando padrão coloração intensa (+++); **B** (100X) Carcinoma ductal apresentando padrão de coloração moderada (++); **C** (100X) Fibroadenoma mamário apresentando padrão coloração moderada (++); **D** (100X) Tecido mamário normal de gatas, onde não foram evidenciadas células PAS+.

\* - Evidência da coloração nos tecidos.



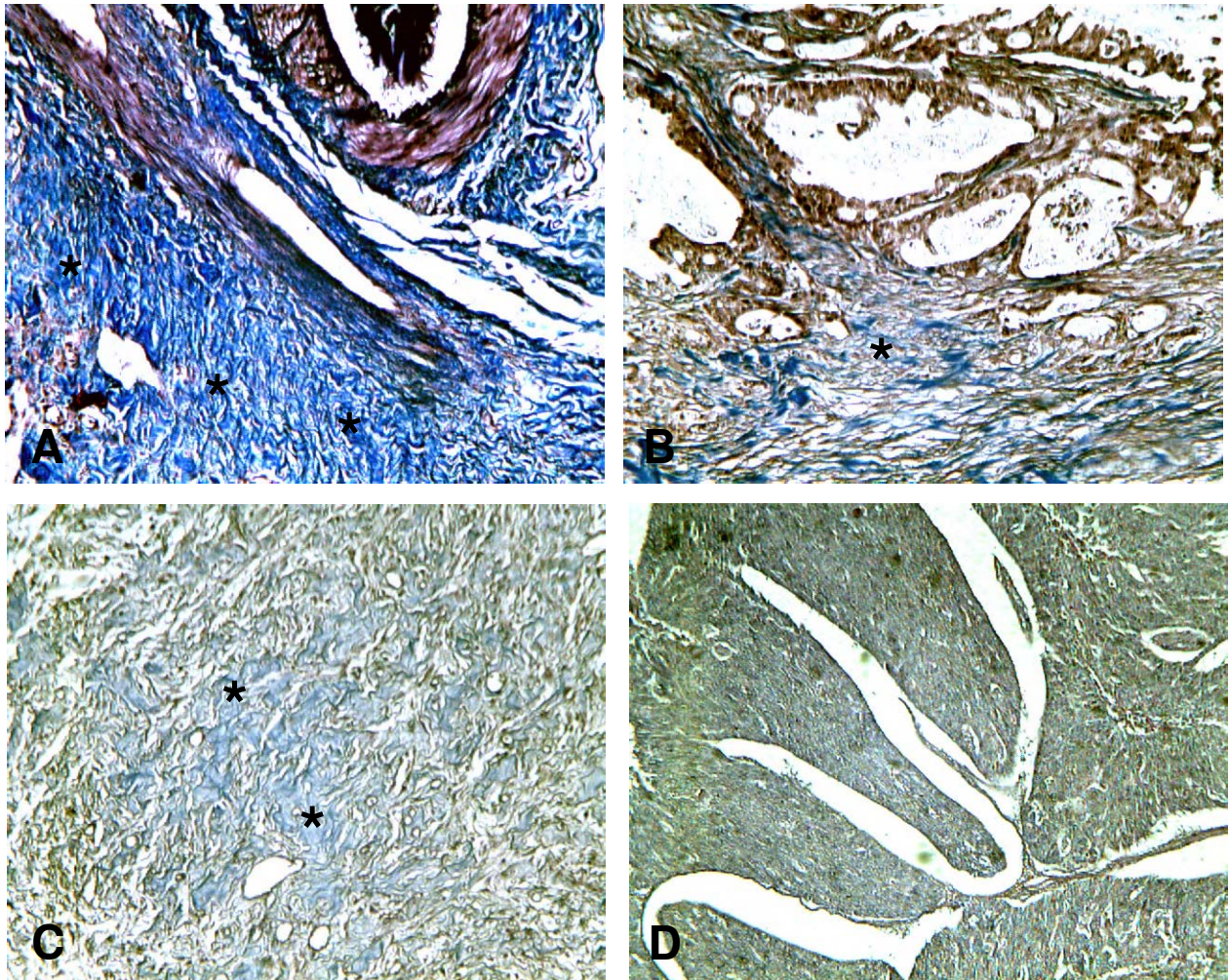


Fig. 02: Marcação histoquímica dos tecidos neoplásicos mamários de gatas (*Felis catus*) com Tricrômico de Masson (TM). **A** (100X) Fibroadenoma mamário apresentando padrão coloração intensa (+++); **B** (100X) Carcinoma mucinoso apresentando padrão de coloração moderada (++); **C** (100X) Carcinoma ductal apresentando padrão coloração fraca (+); **D** (100X) Carcinoma papilar, onde não foram evidenciadas quantidades significativas de colágeno intestinal. \* - Evidência da coloração nos tecidos.



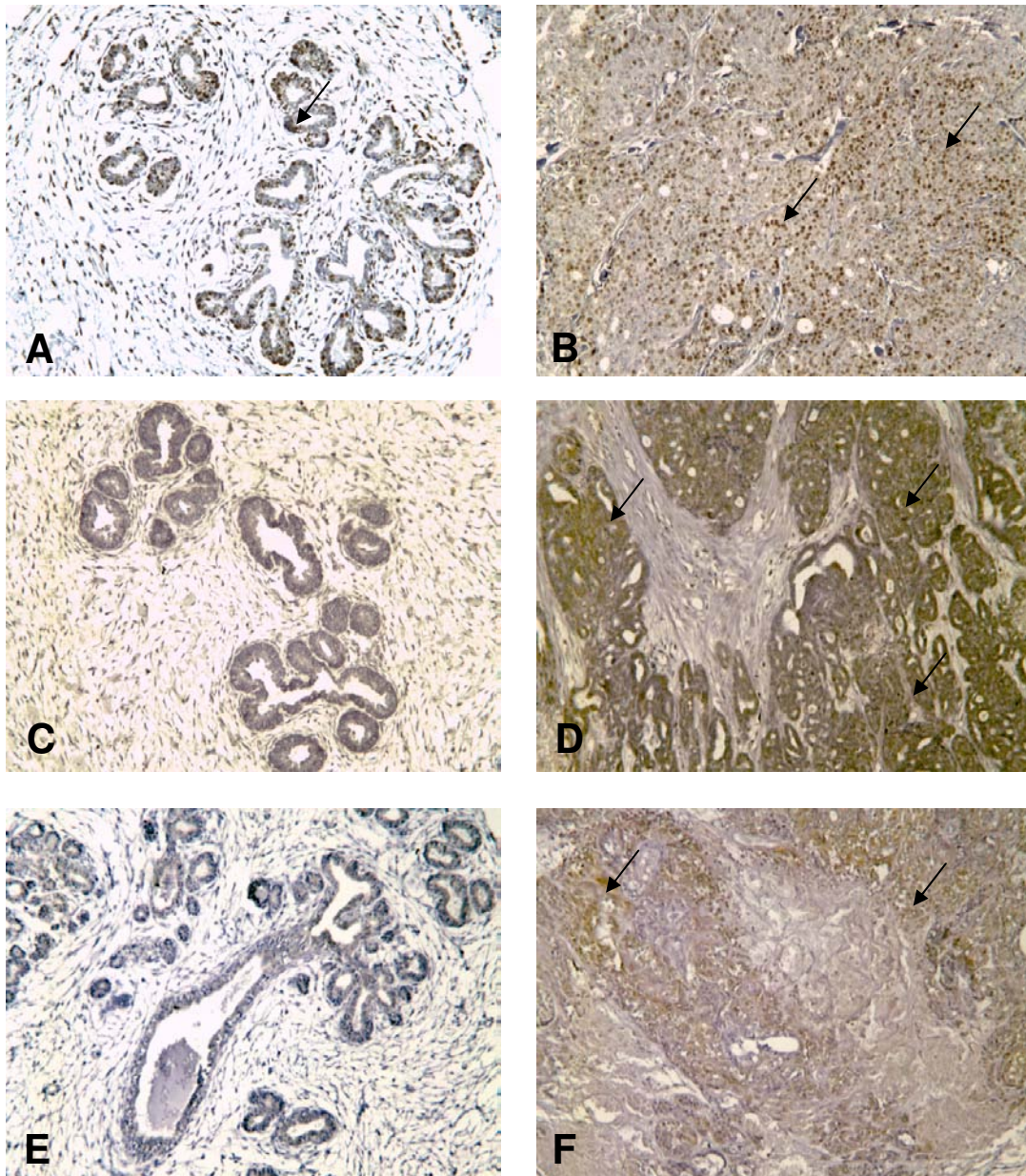


Fig. 03: Marcação imunoistoquímica dos tecidos neoplásicos mamários de gatas (*Felis catus*) com anticorpos PCNA, Ki-67 e Bcl-2. **A** (100X) Fibroadenoma apresentando marcação positiva para PCNA (padrão de marcação citoplasmático e nuclear); **B** (100X) Carcinoma sólido apresentando intensa marcação do PCNA (padrão de marcação citoplasmático e nuclear); **C** (100X) Fibroadenoma mamário apresentando negatividade ao Ki-67; **D** (100X) Carcinoma mamário apresentando positividade à marcação do Ki-67 (padrão de marcação citoplasmático e nuclear); **E** (100X) Fibroadenoma mamário apresentando negatividade ao Bcl-2; **F** (100X) Carcinoma mamário apresentando positividade à marcação do Bcl-2 (padrão de marcação membranar restrito ao tecido transformado). → evidência da marcação imunoistoquímica.

## ***Considerações Finais***

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A maioria dos neoplasmas felinos apresenta característica de malignidade (carcinomas sólidos ou túbulo-papilares) e o tipo tumoral benigno mais frequente é o fibroadenoma;
- Histologicamente os tumores malignos são multifocais, padrão de crescimento predominantemente invasivo, com presença de necrose, figuras de mitose, infiltrado inflamatório e gradação histológica (HII e HIII) e citológica (C1 e C2) alta;
- Houve aumento na distribuição de colágeno intersticial e células PAS+ em carcinoma mucinoso e fibroadenomas;
- As neoplasias malignas apresentam maior reatividade decrescente à marcação com o anticorpo PCNA, seguido por Ki-67 e Bcl-2. Nos tumores benignos houve marcação tecidual apenas para PCNA e Ki-67;
- Os dados sugerem que os neoplasmas malignos em felinos têm intensa atividade proliferativa evidenciando um mau prognóstico e conseqüentemente, pode resultar em um menor tempo de sobrevivência pós-cirúrgico aos animais acometidos.

### 5.1. PERSPECTIVAS

- Realizar análises ultra-estruturais no tecido neoplásico, obtido de lesões mamárias espontâneas de gatas;
- Realizar estudos de patologia comparada, utilizando os carcinomas mamários de gatas como modelo de câncer de mama feminino;
- Testar a proteína Nectina-4 como novo marcador histopatológico para o tumor mamário em felinos;
- Avaliar comparativamente a expressão tecidual dos marcadores ER, PR e E-caderina, em tumores mamários de gatas e humanos;
- Analisar a expressão de enzimas, tais como MMP-2 e MMP-9, no tecido neoplásico mamário de gatas e correlacionar os achados com o prognóstico pós-cirúrgico dos animais.

***Anexos***

## ANEXOS

### NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DA REVISTA *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*.

#### INSTRUÇÕES AOS AUTORES



ISSN 0102-0935 *versão impressa*  
ISSN 1678-4162 *versão online*

- [Tipos de artigos aceitos para publicação](#)
- [Política editorial](#)
- [Preparação dos manuscritos para publicação](#)
- [Citações bibliográficas](#)
- [Submissão dos trabalhos](#)

#### Tipos de artigos aceitos para publicação

**Artigo Científico.** É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa. Seções do texto: Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão e Conclusões. O número total de páginas não deve exceder a 15.

**Relato de Caso.** Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada. Seções do texto: Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes). O número total de páginas não deve exceder a 10.

**Comunicação.** É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico. Levantamentos de dados (ocorrência, diagnósticos, etc.) também se enquadram aqui. Deve ser compacto, com no máximo seis páginas impressas, sem distinção das seções do texto especificadas para "Artigo Científico", embora seguindo aquela ordem. Quando a comunicação for redigida em português deve conter um "Abstract" e quando redigida em inglês deve conter um "Resumo".



## Política editorial

Publicar trabalhos científicos originais (artigos, relatos de casos e comunicações) que sejam de interesse para o desenvolvimento da ciência animal. Serão recomendados para publicação somente os trabalhos aprovados pelos editores, baseados na recomendação de dois revisores científicos da área pertinente e/ou do corpo editorial.

## Preparação dos manuscritos para publicação

Os trabalhos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras. Os trabalhos submetidos em inglês deverão conter resumo em português e vice-versa.

Os trabalhos e ilustrações deverão ser apresentados em Microsoft Word, folha no formato A4, fonte Times New Roman tamanho 12, espaço entre linhas 1,5, margens de 3cm, com páginas e linhas numeradas (numeração contínua).

### Seções de um trabalho

**Título.** Em português e em inglês. Deve ser o resumo do resumo e não ultrapassar 100 dígitos.

**Autores.** Os nomes dos autores virão abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. Deve estar indicado o autor para correspondência com endereço completo, telefone, fax e e-mail.

**Resumo e Abstract** devem conter no máximo 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título. Cada frase é uma informação. Atenção especial às conclusões.

**Palavras-chave e Keywords.** No máximo cinco.

**Introdução.** Explanação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência, relevância e os objetivos do trabalho.

**Material e Métodos.** Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Não usar subtítulos.

Nos trabalhos que envolvam animais ou organismos

geneticamente modificados deverá constar o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança.

**Resultados.** Apresentar clara e objetivamente os principais resultados encontrados.

**Discussão.** Discutir somente os resultados obtidos no trabalho.

**Obs.:** As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto.

**Conclusões.** As conclusões devem estar apoiadas nos dados da pesquisa executada.

**Ilustrações.** São tabelas e figuras. Toda ilustração que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, dados sobre a fonte (autor, data) e a correspondente referência deve figurar na lista bibliográfica final.

**Tabela.** Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação do cabeçalho e no final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas.

**Figura.** Qualquer ilustração constituída ou que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. As legendas recebem inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Fig., mesmo se referir a mais de uma figura. As figuras devem ser enviadas em arquivo separado, extensão.jpg.

**Agradecimentos.** Devem ser concisamente expressados.

**Referências bibliográficas.** As referências devem relacionadas em ordem alfabética.

### **Citações bibliográficas**

Citações no texto deverão ser feitas de acordo com ABNT/NBR 10520 de 2002. A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

- autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)
- dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)
- mais de dois autores: (Ferguson et al., 1979) ou Ferguson et al. (1979)
- mais de um trabalho citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson et al. (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson et al., 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para trabalhos do mesmo ano.

*Citação de citação.* Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão citado por e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Na listagem de referência, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

*Comunicação pessoal.* Não fazem parte da lista de referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

### Referências bibliográficas

São adotadas as normas ABNT/NBR-6023 de 2002, simplificadas conforme exemplos:

#### Periódicos

**ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL.** v.48, p.351, 1987-88.

**FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L.** Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

**HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A.** et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

#### Publicação avulsa

**DUNNE, H.W.** (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. 981p.

**LOPES, C.A.M.; MORENO, G.** Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

**MORRIL, C.C.** Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

**NUTRIENT** requirements of swine. 6.ed.  
Washington: *National Academy of Sciences*, 1968. 69p.

**SOUZA, C. F. A.** *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f.  
Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

### **Documentos eletrônicos**

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995.  
Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. *Miami Herald*, 1994. Disponível em:  
<<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

### **Submissão dos trabalhos**

A submissão dos trabalhos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico  
[www.abmvz.org.br](http://www.abmvz.org.br)

### **Taxas de publicação**

Taxa de submissão. O pagamento, no valor de R\$30,00, será feito por meio de boleto bancário (emitido quando da submissão do artigo). O autor deverá informar os dados para emissão da nota fiscal (Nome ou Razão Social, CPF ou CNPJ, Endereço).

Taxa de publicação. A taxa de publicação de R\$55,00, por página impressa, será cobrada do autor indicado para

correspondência, por ocasião da prova final do artigo. Se houver necessidade de impressão em cores, as despesas correrão por conta dos autores.

[\[Home\]](#) [\[Sobre esta revista\]](#) [\[Corpo editorial\]](#) [\[Assinaturas\]](#)



Todo o conteúdo do periódico, exceto onde está identificado, está licenciado sob uma [Licença Creative Commons](#)

**Caixa Postal 567**  
**30123-970 Belo Horizonte MG Brasil**  
**Tel: +55 31 3499-2042**  
**Fax: +55 31 3499-2041**



[journal@vet.ufmg.br](mailto:journal@vet.ufmg.br)

**TRABALHOS CIENTÍFICOS DESENVOLVIDOS DURANTE O DOUTORADO**

- **Artigos completos publicados em periódicos**

SANTOS, P.E.A.; SALES, I.R.F.; SCHIRATO, G.V.; COSTA, V.M.A.; ALBUQUERQUE, M.C.P.A.; SOUZA, V.M.O.; MALAGUEÑO, E. Influence of maternal schistosomiasis on the immunity of adult offspring mice. *Parasitology Research.* , v.107, p.95 - 102, 2010.

SILVA, F.O.; ARAUJO, R.V.S.; SCHIRATO, G.V.; HOLANDA, E.T., MELO-JÚNIOR, M.R.; CAVADA, B.S.; LIMA-FILHO, J.L.; LEÃO, A.M.A.C.; PORTO, A.L.F. Perfil de proteases de lesões cutâneas experimentais em camundongos tratadas com a lectina isolada das sementes de *Canavalia brasiliensis*. *Ciência Rural*, v.39, p.1808 - 1814, 2009.

- **Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)**

AIRES, A.I.; FEITOSA, T.M.A.; SILVA, R.A.R.; NEVES, J.K.; ANJOS, Z.P.; SCHIRATO, G.V.; MALAGUEÑO, E.; ALBUQUERQUE, M.C. Acute hepatoesplenomegaly alterations in mice infected by *Schistosoma mansoni* treated with N-acetylcysteine and/or praziquantel. In: International Symposium on Schistosomiasis, 2010, Rio de Janeiro-RJ.

AIRES, A.I.; FEITOSA, T.M.A.; NEVES, J.K.; SILVA, R.A.R.; FARIAS, A.M.; ANJOS, Z.P.; SCHIRATO, G. V.; ALBUQUERQUE, M.C.; MALAGUEÑO, E. Bioquímica dos indicadores de função hepática em camundongos esquistossomóticos tratados com N-acetylcysteine e/ou praziquantel. In: XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (MEDTROP 2010), 2010, Foz do Iguaçu-PR.

SCHIRATO, G. V.; SILVA, F.O.; SILVA, V. R.; RIBEIRO, E. L.; PEIXOTO, C. A.; MELO-JÚNIOR, M.R.; PORTO, A.L.F. Caracterização histopatológica e imuno-histoquímica de neoplasmas mamários espontâneos de gatas (*Felis catus*). In: VI Congresso Franco-Brasileiro de Oncologia, 2010, Rio de Janeiro-RJ.

AIRES, A.I.; SILVA, R.A.R.; FEITOSA, T.M.A.; TEIXEIRA, L.H.S.; SCHIRATO, G.V.; PONTES-FILHO, N.T.; ARAUJO, S.B.; SOUZA, V.O.; COSTA, V.M.M.A.; MALAGUEÑO, E.; ALBUQUERQUE, M.C. Evaluation of the N-acetylcysteine in the

immunopathology of the experimental *Schistosomiasis mansoni*. In: International Symposium on Schistosomiasis, 2010, Rio de Janeiro-RJ.

SILVA, R.A.R.; AIRES, A.I.; FARIAS, A.M.; SCHIRATO, G. V., ALBUQUERQUE, M.C.; MALAGUEÑO, E. Índice de hepatoesplenomegalia em camundongos esquistossomóticos tratados com N-acetilcisteína e/ou praziquantel. In: 1º Encontro Brasileiro para Inovação Terapêutica, 2010, Recife-PE.

SCHIRATO, G. V. Organização funcional de profissionais que trabalham com animais de laboratório, segundo as normas da FELASA: experiência do Biotério Experimental do Instituto Aggeu Magalhães (FIOCRUZ-PE). In: I Jornada Nacional de Bioteristas, 2010, Buenos Aires (Argentina).

LEITE, A.K.A.; NUNES-PINHEIRO, D.C.S.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q.; SCHIRATO, G. V.; SILVA, F.O.; DIAS, L. Potencial cicatrizante de *Ouratea sp.* em modelos experimentais *in vivo*. In: V Reunião Regional da FeSBE, 2010, Aracaju-SE.

SCHIRATO, G. V.; SOUZA, G. T.; ROCHA, L.T.; BATISTA, M.C.; GOMES, Y.M. Implantação do programa de capacitação prático em experimentação animal para os usuários de biotério do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM - FIOCRUZ-PE). In: VIII Congresso Brasileiro de Bioética - Bioética, direitos e deveres no mundo globalizado, 2009, Búzios - RJ.

SILVA, R.A.R.; AIRES, A.I.; FARIAS, A.M.; SCHIRATO, G. V.; ALBUQUERQUE, M.C.; MALAGUEÑO, E. Índice de hepatoesplenomegalia em camundongos esquistossomóticos tratados com N-acetilcisteína e/ou praziquantel. In: 1º Encontro Brasileiro para Inovação Terapêutica, 2009, Recife-PE.

SANTOS, P.E.A.; SALES, I.R.F.; SCHIRATO, G.V.; SOUZA, V.O., MALAGUEÑO, E. Immunomodulation in mice born or breastfed in *Schistosoma mansoni*-infected mothers. In: I Congreso Nacional da Asociación Argentina de Ciencia y Tecnologia de Animales de Laboratorio, 2007, Buenos Aires (Argentina).

SOUZA, V.O.; SANTOS, P.E.A.; SALES, I.R.F.; SCHIRATO, G.V.; MALAGUEÑO, E. Immunomodulation in mice born or suckled in *Schistosoma mansoni* mothers. In: 13th International Congress of Immunology, 2007, Rio de Janeiro-RJ.

SILVA, F.O.; ARAUJO, R.V.S.; SCHIRATO, G.V.; CAVADA, B.S.; LIMA-FILHO, J.L.; LEÃO, A.M.A.C.; PORTO, A.L.F. Protease activity in experimental wounds treated with *Canavalia brasiliensis* lectin seeds using mice as model of wound healing. In: I Congreso Nacional Asociación Argentina de Ciencia y Tecnología de Animales de Laboratorio, 2007, Buenos Aires (Argentina).

MONTEIRO, F.M.F.; SCHIRATO, G.V.; ARAÚJO, J.P.F.; SILVA, J.B.R.; SILVA, G.M.; SILVA, F.O.; PORTO, C.S.; LIMA-FILHO, J.L.; CUNHA, M.G.C.; LEÃO, A.M.A.C.; PORTO, A.L.F. Use of POLICAJU/NaCl film containing entrapped trypsin as primary occlusive dressing in experimental skin lesions. In: XXXVI Annual Meeting of the SBBq, 2007, Salvador-BA.

- **Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)**

SANTOS, P.E.A.; SALES, I.R.F.; SCHIRATO, G.V.; SOUZA, V.O.; MALAGUEÑO, E. Alteração na resposta imune humoral anti-ova em camundongos nascidos ou amamentados em mães infectadas pelo *Schistosoma mansoni* In: 1st International Workshop on Biotechnology, 3rd Alfa-Valnatura Meeting, 3rd Scientific Journey of LIKA, 2008, Recife-PE.

SILVA, F.O.; ARAUJO, R.V.S.; SCHIRATO, G.V.; LIMA, M.C.G.; CAVADA, B.S.; LIMA-FILHO, J.L.; LEÃO, A.M.A.C.; PORTO, A.L.F. Atividade proteolítica em lesões cutâneas tratadas com a lectina de sementes isoladas de *Canavalia brasiliensis* livre e conjugada com o seu açúcar específico In: VII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE, 2007, Recife-PE.