VERÔNICA MOLLICA GOVONI

**Valor prognóstico de parâmetros clínico-patológicos e dos subtipos
moleculares nos carcinomas mamários em felinos**

São Paulo

2017

VERÔNICA MOLLICA GOVONI

**Valor prognóstico de parâmetros clínico-patológicos e dos subtipos
moleculares nos carcinomas mamários em felinos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Bruno Cogliati

São Paulo

2017

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3538
FMVZ

Govoni, Verônica Mollica

Valor prognóstico de parâmetros clínico-patológicos e dos subtipos moleculares nos carcinomas mamários em felinos. / Verônica Mollica Govoni. -- 2017.
72 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Cogliati.

1. Tumor mamário. 2. Gata. 3. Imuno-histoquímica. 4. Sobrevida. I. Título.

São Paulo, 03 de julho de 2017
CEUA N 4291070715

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Bruno Cogliati
Área: 0
Bruno Cogliati (orientador)

Título da proposta: "Valor prognóstico de parâmetros clínico-patológicos e dos subtipos moleculares nos carcinomas mamários em felinos".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 30/junho/2017) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Houve uma mudança do foco do projeto, dessa forma se faz necessária a alteração do título e a diminuição do número de animais. A mudança no foco foi influenciada pela dificuldade em alcançar número grande de animais para coleta de material fresco para extração de DNA e por restrição orçamentária para a realização do processo de extração e quantificação de DNA seguida da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a amplificação dos éxons dos genes BRCA1 e BRCA1 em um grande número de amostras e sequenciamento, a tempo. Sendo assim foi realizada a pesquisa da expressão de marcadores prognósticos para o carcinoma mamário felino, incluindo receptor de estrógeno e progesterona, HER-2, Ki67 e CK 5/6, dividindo os tumores em subtipos moleculares em 37 amostras de material parafinado proveniente de arquivo e 13 amostras coletadas de forma prospectiva, totalizando amostras de 42 animais."

Comentário da CEUA: " Alteração de título solicitada pelo Pesquisador para melhor representação do proposto no estudo."

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: GOVONI, Verônica Mollica

Título: Valor prognóstico de parâmetros clínico-patológicos e dos subtipos moleculares nos carcinomas mamários em felinos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico à minha família.

À minha mãe, Marida de Lourdes (Dilu) Mollica, sempre doce e ao mesmo tempo firme. Minha maior incentivadora desde a infância; sempre preocupada em me conceder todas as oportunidades para alcançar cada sonho pessoal e evoluir como profissional. Seu amor, carinho, força, cuidado, e vibração a cada passo dado me trouxeram um estímulo essencial para mais esta jornada.

Ao meu pai, Wainer Serra Govoni, pelo esforço de sempre me fornecer todo suporte necessário, e me mostrar a vida mais leve em momentos difíceis. Sua história de vida me serve como exemplo de superação e seu jeito espirituoso e animado me enchem de alegria. Reconheço cada gesto de carinho e eles me fazem sentir sempre acolhida e segura.

Ao meu irmão, Enrico Mollica Govoni, que antes de ser a pessoa de maior proximidade genética, é um amigo para todas as horas. Sendo um pouco mais velha e tendo acompanhado todo seu crescimento, me encho de orgulho pela pessoa que se tornou. Sua organização e responsabilidade ímpares muito me ensinaram nestes últimos anos, e seu jeito amoroso me faz sentir sempre em casa.

Todo apoio e ajuda vindo de vocês, meu mais forte alicerce, foi parte fundamental deste trabalho. Minha gratidão é enorme, sempre.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Bruno Cogliati, por todos ensinamentos nestes dois anos. Com sabedoria e dedicação notáveis, sempre se fez presente, de forma solícita e paciente. Ao sair de uma residência em cirurgia, fui muito feliz ao embarcar no “mundo da patologia e da oncologia” com o privilégio de sua orientação.

Aos colegas, integrantes e ex-integrantes do Laboratório de Patologia Morfológica e Molecular (LAPMOL):

À Dra. Isabel Veloso Alves Pereira, pela ajuda, conselhos e parceria. Sua competência e dedicação à pesquisa são exemplares. Agradeço todo o suporte, não apenas durante seu período no laboratório, como também após. Sua preocupação, cuidado e amizade se fizeram muito especiais.

À Dra. Tereza Cristina da Silva, pela ajuda e enorme disposição. Ensinou e me acompanhou em minha primeira imunohistoquímica, e assim por diante no que fosse preciso. Admiro seu empenho, dedicação e entusiasmo ao passar conhecimento, de maneira tão didática. E agradeço a amizade construída.

À doutoranda Juliana Guerra, pela enorme colaboração neste período, sempre prestativa e paciente. Com seu amplo conhecimento, seus esclarecimentos e auxílio, acompanhados de serenidade e simpatia, foram de grande importância. Obrigada por todo carinho e atenção.

À Jennifer Freytag, minha irmã de mestrado, pelo companheirismo e parceria nessa trajetória. Agradeço cada ajuda, cada momento dispensado, repleto de atenção, carinho e amizade.

Ao doutorando Guilherme Romualdo, pela convivência nas manhãs e tardes de laboratório, trazendo sua experiência e disposição em ajudar. Agradeço pela amizade que nasceu e se fortaleceu a partir daí.

Aos colegas de mestrado: David Salas, por se tornar amigo e compartilhar experiências e um pouco da cultura colombiana, trazendo ao laboratório sua animação e seu jeito divertido. À Ísis Paixão, agradeço o carinho e parceria durante as coletas prospectivas. À Julieta Porto, pelo carinho, à Cintia Maria e à Taynã Tibúrcio pela ajuda no início do mestrado.

Aos colegas da Bélgica que estiveram presentes no laboratório e participaram da minha história ali: Joost, Michael e especialmente à Sara, pela amizade que se formou.

Às alunas e ex-alunas de iniciação científica que colaboraram e participaram de alguma forma: Lygia Guidi, Evelyn Zanesco, Bruna Goes, Daniele Felisbino, Bianca Matsushita, Andressa Lima e Valeria Veras.

Às colegas de mestrado de fora do LAPMOL, e amigas: Ana Luiza Nairismagi Alves e Jéssica Soares Garcia. Neste período de convivência, compartilhamento de experiências, alegrias e angústias; uma grande amizade se formou. Tenho muito a agradecer pelas conversas, viagens, almoços, risadas e ajudas.

Ao Dr. Valter Winkel, o qual tive oportunidade de conhecer no laboratório durante seus experimentos de doutorado, e construir uma amizade levada para além da USP. Agradeço os conselhos, além da enorme disposição em ajudar e carinho de sempre.

À Prof. Dra. Maria Lucia Zaidan Dagli, por manter as portas de seu laboratório sempre abertas, auxiliando muito nas etapas do projeto. E a toda equipe do laboratório.

Ao Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez, por permitir o acesso ao seu laboratório para uso do microscópio e obtenção de fotos das lâminas de histologia e imunohistoquímica; e ao técnico Diogo Nader Palermo pelo suporte.

Ao MSc. Rodrigo Ubukata, por me incentivar a procurar outras áreas além da cirurgia e me ensinar tanto sobre oncologia, sempre me aconselhando e recebendo com muito carinho e atenção.

À equipe das Faculdades Metropolitanas Unidas (FMU): Camila Utrera Zanoni, Pedro Nasser, Juliana Midori, Felipe Russo, e todos os demais, pela colaboração e parceria no fornecimento de amostras e de informações necessárias sobre os animais, durante coletas prospectiva, colaborando muito com o desenvolvimento do trabalho.

Ao Dr. Fabrizio Grandi, Professor Luciano Giovaninni, Dra. Priscila Pedra, Lucas Freitas, Carolina Carvalho, Carina Carvalho, Alessandra Rinah, ao Prof Dr, José Fernando Ibanez e toda equipe do Hospital Veterinário Público – ANCLIVEPA/SP, pelo fornecimento de amostras para e informações para o estudo retrospectivo e coletas prospectivas, com grande contribuição ao projeto.

À toda equipe da Onco Cane – Oncologia Veterinária: Dra. Renata Sobral, Dra. Aline Zoppa, Dra. Suzana Honda, pela colaboração no fornecimento de amostras para coleta prospectiva, além das informações necessárias, tendo sido de grande importância para este estudo.

Ao Msc. Marcello Vannucci Tedardi, pela pronta atenção, prestatividade, educação e auxílio em toda estatística do trabalho.

À minha avó, Suzana Maria de Tolosa Mollica, por ser avó e avô ao mesmo tempo, tão presente e cuidadosa desde a infância. Agradeço o carinho de sempre, as lembranças boas e a torcida em cada fase da minha vida.

Aos amigos, sejam eles de Guaratinguetá, Botucatu, Curitiba, ou outra, que fizeram parte de alguma forma deste período, e àqueles que se mantiveram até aqui. Em especial, agradeço à amiga Priscila Emiko Kobayashi (Sarna), pelo apoio mesmo que de longe, pelas conversas sobre patologia e sobre a vida, e pelos conselhos.

À minha cunhada Nicole Araujo Presta, pela amizade e pela força dada neste período, tendo uma participação especial.

Aos amigos do Departamento de Patologia (VPT) - USP

À colega e amiga Tatiana Cristina Silva, pela indicação do livro “O Imperador de Todos os Males”.

Aos demais familiares que participaram de alguma forma dessa trajetória.

A todo pessoal da Hospedaria Santo André, que desde a minha primeira estada em São Paulo para o estágio curricular, em 2011, me recebe com tanto carinho. Neste período, me fizeram sentir menos longe de casa.

A todos os professores que fizeram parte da minha trajetória até aqui, agregando conhecimento e inspiração.

Ao programa de pós-graduação em Patologia Experimental e Comparada do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida e reserva técnica (Processo 2015/15689-0).

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro no início do mestrado.

À secretaria e todos os funcionários do VPT, pelo suporte.

Aos funcionários da biblioteca da FMVZ – USP

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma colaboraram, participaram ou torceram por mim e pelo trabalho.

“O entusiasmo é a maior força da alma.
Conserva-o e nunca te faltará poder
para conseguires o que desejas. ”

Napoleon Hill

RESUMO

GOVONI, V. M. **Valor prognóstico de parâmetros clínico-patológicos e dos subtipos moleculares nos carcinomas mamários em felinos.** [Prognostic value of clinicopathological parameters and molecular subtypes in feline mammary carcinoma] 2017. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O tumor mamário é a terceira neoplasia mais incidente na espécie felina, seguida das neoplasias hematopoiéticas e cutâneas. Nos gatos, diferentemente do observado em cães e humanos, cerca de 85 a 95% dos tumores mamários são malignos e a doença tende a apresentar um comportamento mais agressivo. Desta forma, parâmetros clínico-epidemiológicos, patológicos e moleculares têm sido propostos como fatores prognósticos nesta espécie, porém os resultados ainda são controversos. Recentemente, uma nova classificação molecular foi proposta nesta doença em felinos, na qual foram estabelecidos seis subtipos moleculares de acordo com o “St. Gallen International Expert Consensus Panel” para humanos. Assim, o presente estudo teve como principal objetivo investigar o valor prognóstico de parâmetros clínico-patológicos e dos subtipos moleculares no carcinoma mamário em felinos. Foram analisados 65 tumores, provenientes de 42 gatas atendidas em hospitais veterinários públicos e particulares. Os tumores foram submetidos à análise histopatológica e imuno-histoquímica para os receptores de estrógeno e progesterona, HER-2, Ki67 e citoqueratina 5/6. Os parâmetros clínico-patológicos foram correlacionados com a sobrevida pelo teste de Log-rank ($p < 0,05$). Os tipos histológicos mais frequentes foram os carcinomas tubulopapilares, sólidos e cribiformes, a maioria graduados como grau II. Em relação aos subtipos moleculares, os tumores foram classificados em triplo negativo “normal-like” (35,4%), triplo negativo “basal-like” (29,1%), HER-2 positivo (25%) e Luminais A e B (10,5%). Em relação aos fatores prognósticos, animais com idade superior a 12 anos ($p = 0,0036$) e com tumores ulcerados ($p = 0,0139$) demonstraram correlação significativa com menor tempo de sobrevida. Os parâmetros raça, *status* reprodutivo, uso de anticoncepcional, tratamento, tamanho e volume tumorais, multiplicidade tumoral, morfologia, grau histológico, índice de proliferação e os subtipos moleculares não apresentaram correlação com a sobrevida. Os resultados demonstrados aqui ressaltam a importância da correlação clínica, patológica e molecular na determinação dos fatores prognósticos e, consequentemente, no desenvolvimento de novos procedimentos e alvos terapêuticos.

Palavras-chave: tumor mamário, gata, imuno-histoquímica, sobrevida

ABSTRACT

GOVONI, V. M. **Prognostic value of clinicopathological parameters and molecular subtypes in feline mammary carcinoma.** [Valor prognóstico de parâmetros clínico-patológicos e dos subtipos moleculares nos carcinomas mamários em felinos] 2017. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

The mammary tumor is the third most frequent neoplasm in the feline species, followed by hematopoietic and cutaneous neoplasms. In cats, unlike that observed in dogs and humans, about 85 to 95% of mammary tumors are malignant and the disease tends to present more aggressive behavior. In this way, clinical-epidemiological, pathological and molecular parameters have been proposed as prognostic factors in this species, but the results are still controversial. Recently, a new molecular classification was proposed in this feline disease, in which six molecular subtypes were established according to "St. Gallen International Expert Consensus Panel" for humans. Thus, the present study had as main objective to investigate the prognostic value of clinical-pathological parameters and molecular subtypes in mammary carcinoma in felines. A total of 65 tumors were analyzed, from 42 cats treated in public and private veterinary hospitals. Tumors were submitted to histopathological and immunohistochemical analysis for the estrogen and progesterone receptors, HER-2, Ki67 and cytokeratin 5/6. The clinical-pathological parameters were correlated with survival by the log-rank test ($p < 0.05$). The most frequent histological types were tubulopapillary carcinomas, solid and cribriform, commonly grade II. Tumors were classified as "normal-like" (35.4%), triple negative "basal-like" (29.1%), HER-2 positive (25%) and Luminais A And B (10.5%). Regarding the prognostic factors, animals aged over 12 years ($p = 0.0036$) and ulcerated tumors ($p = 0.0139$) showed a significant correlation with a shorter survival time. The parameters race, reproductive status, use of contraceptive, treatment, tumor size and volume, tumor multiplicity, morphology, histological grade, proliferation index and molecular subtypes had no correlation with survival. The results demonstrated here emphasize the importance of clinical, pathological and molecular correlation in the determination of prognostic factors and, consequently, in the development of new procedures and therapeutic targets.

Key words: breast tumor, cat, immunohistochemistry, survival

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fotomacrografia de formação tumoral após cirurgia de mastectomia bilateral (coleta prospectiva).....	41
Figura 2- Fotomacrografia e fotomicrografia da metástase em linfonodo regional.	41
Figura 3- Fotomicrografia de carcinoma mamário tubulopapilar.	42
Figura 4- Fotomicrografia de carcinoma mamário sólido.	42
Figura 5- Fotomicrografia de carcinoma mamário cribiforme.	43
Figura 6- Fotomicrografias ilustrativas de painel molecular de tumor mamário em felinos. .	44
Figura 7- Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos animais estudados em função da idade .	45
Figura 8- Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos animais estudados em função da raça	46
Figura 9- Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos animais estudados em função do status reprodutivo.....	47
Figura 10- Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos animais estudados em função do uso de anticoncepcional	48
Figura 11- Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos animais estudados em função do tratamento instituído	49
Figura 12- Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos animais estudados em função do tamanho tumoral (de acordo com o estadiamento de MORRIS, (2013)	50
Figura 13- Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos animais estudados em função do volume tumoral.	51
Figura 14- Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos animais estudados em função da presença de ulceração.	52
Figura 15- Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos animais estudados em função de tumores únicos ou múltiplos.	53
Figura 16- Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos animais estudados em função dos tipos histológicos.	54
Figura 17- Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos animais estudados em função da graduação histológica.	55
Figura 18- Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos animais estudados em função do Ki67 (cutoff de 14%)	56
Figura 19- Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos animais estudados em função dos tipos moleculares	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Condições e reagentes padronizados para as reações de imuno-histoquímica em tecido de felinos. São Paulo, 2017.	35
Tabela 2- Características clínicas das 42 gatas incluídas no estudo. São Paulo, 2017.	38
Tabela 3- Características clínico-patológicas dos 65 tumores provenientes de 42 gatas.	39
Tabela 4- Características clínico-patológicos e moleculares dos animais e tumores. São Paulo, 2017.	40
Tabela 5- Correlação entre a idade das gatas acometidas pelo carcinoma mamário, associada a sobrevida, pelo teste estatístico de Log-rank. São Paulo, 2017.	45
Tabela 6- Correlação entre as raças acometidas pelo carcinoma mamário, associada a sobrevida, pelo teste estatístico de Log-rank. São Paulo, 2017.	46
Tabela 7- Correlação para o status reprodutivo dos animais acometidos pelo carcinoma mamário felino, associada a sobrevida, pelo teste estatístico de Log-rank. São Paulo, 2017.	47
Tabela 8- Correlação para o uso de anticoncepcionais, associado a sobrevida, para os animais acometidos pelo carcinoma mamário felino, pelo teste estatístico de Log-rank. São Paulo, 2017	47
Tabela 9- Correlação entre os tipos de tratamento instituídos, associados à sobrevida, para os animais acometidos pelo carcinoma mamário felino, pelo teste estatístico de Log-rank. São Paulo, 2017	48
Tabela 10- Correlação entre os diferentes tamanhos (estadiamento de MORRIS, 2013), associados à sobrevida, para os animais acometidos pelo carcinoma mamário felino, pelo teste estatístico de Log-rank. São Paulo, 2017	49
Tabela 11- Correlação entre os diferentes volumes, associados à sobrevida, para os animais acometidos pelo carcinoma mamário felino, pelo teste estatístico de Log-rank. São Paulo, 2017	50
Tabela 12- Correlação entre a presença de ulceração ou não, associados à sobrevida, para os animais acometidos pelo carcinoma mamário felino, pelo teste estatístico de Log-rank. São Paulo, 2017	51
Tabela 13- Correlação entre o fato dos tumores serem únicos ou múltiplos e a sobrevida, para os animais acometidos pelo carcinoma mamário felino, pelo teste estatístico de Log-rank. São Paulo, 2017	52
Tabela 14- Correlação entre os tipos morfológicos, relacionada a sobrevida, para os animais acometidos pelo carcinoma mamário felino, pelo teste estatístico de Log-rank. São Paulo, 2017	53
Tabela 15- Correlação entre os diferentes graus histológicos, relacionada à sobrevida, para os animais acometidos pelo carcinoma mamário felino, pelo teste estatístico de Log-rank. São Paulo, 2017	54

Tabela 16- Correlação entre valores acima e abaixo de 14% para Ki67, relacionada à sobrevida, para os animais acometidos pelo carcinoma mamário felino, pelo teste estatístico de Log-rank. São Paulo, 201755

Tabela 17- Correlação entre diferentes subtipos moleculares, de acordo com (Soares, Correia, et al., 2016a), relacionada à sobrevida, para os animais acometidos pelo carcinoma mamário felino, pelo teste estatístico de Log-rank. São Paulo, 201756

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação histopatológica das lesões benignas e malignas no tecido mamário de felinos, de acordo com as diretrizes da Organização Mundial da Saúde	20
Quadro 2- Sistema de Nottingham utilizado para a graduação de tumores mamários em mulheres e utilizado nos tumores em gatas	23
Quadro 3- Novo sistema de graduação proposto para carcinomas mamários invasivos felinos	23
Quadro 4- Sistema TNM modificado para o estadiamento clínico em felinos.	24
Quadro 5- Classificação molecular dos subtipos de tumores de mama em felinos	29

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS	18
2.2	ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS	19
2.2.1	Morfologia	19
2.2.2	Grau histológico	21
2.3	ESTADIAMENTO CLÍNICO	24
2.4	TRATAMENTOS	25
2.5	MARCADORES MOLECULARES E PROGNÓSTICOS	26
2.6	SUBTIPOS MOLECULARES	28
3.	OBJETIVOS	31
3.1	OBJETIVO GERAL.....	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1	CASUÍSTICA.....	32
4.2	PARÂMETROS CLÍNICOS.....	33
4.3	AVALIAÇÃO HISTOPALÓGICA	33
4.4	AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA	34
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
5.	RESULTADOS	37
6.	DISCUSSÃO	58
	REFERÊNCIAS.....	65

1. INTRODUÇÃO

“Cortar o mal pela raiz”

A cura do câncer é algo muito desejado na medicina. Um desejo que serve de combustível para tantos estudos, que já geraram diversos resultados na prevenção e controle da doença. Mas para vencer essa batalha, antes de tudo, é preciso combater o inimigo. E neste combate, é preciso conhecê-lo. Em “O Imperador de Todos os Males: Uma biografia do Câncer”, o oncologista Siddhartha Mukherjee, aborda uma evolução histórica, científica e filosófica do câncer, que muito instiga a reflexão sobre a doença. (MUKHERJEE, 2012) e nos reporta a definição do câncer de mama traduzida de papiros de séculos antes de Cristo: “Uma massa saliente no peito – fria, dura, densa como uma fruta e espalhando-se insidiosamente debaixo da pele; dificilmente haveria uma descrição mais vívida do câncer de mama”.

O mesmo autor nos conta que entre 1891 e 1907, Dr. Halsted, médico nascido em 1852, provara que grandes e meticulosas cirurgias de câncer mamário eram tecnicamente possíveis. O radicalismo tornou-se, na época, fundamental ao pensamento dos cirurgiões, não somente para a mama. Remover o tumor era quase como remover a doença. Dr. Halsted, aparentemente, exterminaria o câncer em sua raiz, porém evidências mostravam que as raízes persistiam.

Mesmo após tantos séculos, um dos pilares do tratamento do câncer de mama ainda é a mastectomia, e por isso muito devemos ao Dr. Halsted. No entanto, inúmeros outros fatores estão associados a um bom resultado terapêutico e estes são inerentes a cada paciente. Sabemos hoje, no que diz respeito à oncologia em geral, que cirurgias menos agressivas podem beneficiar o paciente, enquanto as radicais ainda se fazem necessárias em certos casos. E ainda, sabe-se que as raízes da doença não necessariamente se limitam ao local da lesão. São muito mais profundas e percorrem sorrateiramente por vasos e tecidos sadios.

Conhecendo mais sobre a biologia dos tumores, o tratamento cirúrgico isolado nem sempre é aquele que mais se aproxima do melhor resultado. O prognóstico, em uma analogia ao livro de Siddhartha, é a chance de derrota do Imperador, cujo palácio é construído por inúmeros tijolos, sendo cada tijolo representado por uma variável de valor prognóstico diferente, como o estadiamento clínico, o tipo histológico do tumor, o grau histológico, e mais recentemente, seus subtipos moleculares.

A biologia molecular, desvendada a cada dia pela medicina, nos permite investigar o câncer em diversos de seus aspectos, para que as tais malélicas e indesejadas raízes possam ser exterminadas de fato. A imunohistoquímica, uma das muitas ferramentas moleculares existentes atualmente, une a química e a imunologia ao “tingir” as células tumorais em locais específicos, nos permitindo “despir” a lesão e desvendar alguns de seus mistérios. Nos possibilita assim, o maior conhecimento do inimigo e seu comportamento, e consequentemente, novas estratégias de combate.

O cientista William Woglom opina,

“Quem não tem formação em química ou medicina talvez não perceba quão difícil é a questão do tratamento do câncer. É quase - não tanto, mas quase - tão difícil como descobrir um agente capaz de dissolver a orelha esquerda, por exemplo, e deixar a orelha direita intacta. Tão pequena é a diferença entre a célula cancerosa e seu ancestral normal...”.

Muito já foi estudado e desvendado na medicina humana, porém relativamente pouco na medicina veterinária. Desta forma, muitas estratégias de combate já se usam como terapias alvo para humanos, e pouco ou quase nada para animais.

Pensando, de um lado, no câncer como uma doença ainda misteriosa e desafiadora em todo seu surgimento e desenvolvimento; por outro lado, se pensarmos em uma espécie animal peculiar, de características únicas e por vezes surpreendentes, os gatos rapidamente nos vem à cabeça. Animais igualmente misteriosos, que são fonte de inspiração para tantos escritores e poetas, e o mesmo vale para a ciência, afinal, bem nos lembra a frase de Albert Einstein “A coisa mais bela que podemos vivenciar é o mistério. Ele é fonte fundamental de toda verdadeira arte e de toda ciência”. Juntamos, assim, os mistérios. Estudamos o câncer em gatos, nada mais desafiador nos vem à cabeça.

Levando em consideração a maior agressividade da doença na espécie felina; associado ao pouco conhecimento acerca do carcinoma mamário em gatos quando comparado aos cães; e ainda, que características moleculares similares estão, por vezes, presentes entre a doença humana e a felina; o presente trabalho visa investigar alguns parâmetros clínico-patológicos e marcadores moleculares nesta última espécie. Que conheçamos mais o inimigo, de modo a estabelecer prognósticos mais precisos. E também, que seja dado mais um passo rumo a novas possibilidades terapêuticas, mais específicas e eficazes, onde num futuro de terapias associadas, o carcinoma mamário felino seja exterminado em todas, ou quase todas as suas raízes. Definitivamente.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS

O câncer de mama é a neoplasia mais comum em mulheres e está bem caracterizado como uma doença heterogênea que compreende vários subtipos biológicos, com abordagem clínica e conduta terapêutica distintas (ABRAMSON et al., 2015). Em gatas, os tumores mamários representam até 40% dos casos de neoplasia, sendo o terceiro tipo mais incidente, seguido das neoplasias hematopoiéticas e cutâneas (MACEWEN et al., 1984; MILLANTA et al., 2002b; OVERLEY et al., 2005; VASCELLARI et al., 2009; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013).

A idade média de surgimento da doença nesta espécie está entre 10 e 12 anos, com aumento do risco a partir dos 14 anos de idade. Animais da raça siamesa apresentam maior chance do desenvolvimento precoce da doença, por volta dos 9 anos de idade, além de ser uma raça mais predisposta quando comparada às demais (ZAPPULLI et al., 2015). No entanto, um estudo realizado no Brasil não demonstrou esta predisposição racial, onde a maior parte dos animais acometidos não apresentavam raça definida (CUNHA et al., 2016).

Nos gatos, em contraste do que é observado em cães e humanos, cerca de 85 a 95% dos tumores mamários são malignos (MISDORP, W et al., 1999). A doença tende a apresentar comportamento agressivo, caracterizado por crescimento rápido, altas taxas de proliferação celular e alta capacidade metastática para linfonodos regionais e órgãos distantes, como pulmões, podendo também serem encontradas em pleura, fígado, diafragma, glândulas adrenais, baço, rins, útero e ovários (WEIJER; HART, 1983a; MACEWEN; WITHROW, 1989; MOULTON, 1990; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013). Embora seja menos comum, gatos machos também podem apresentar tumores mamários e, semelhantemente, o comportamento clínico da doença tende a ser mais agressivo (SKORUPSKI et al., 2005; ZAPPULLI et al., 2015).

Ainda, os estudos não apontaram diferenças no comportamento biológico do tumor em animais castrados e inteiros (WEIJER; HART, 1983a; ITO et al., 1996; OVERLEY et al., 2005a). (OVERLEY et al., 2005) mostraram que gatas castradas antes de 6 meses ou antes de 1 ano de idade apresentam, respectivamente, 91% e 86% menos chances de desenvolver a

doença ao longo da vida. Em contrapartida, os animais que receberam tratamento com progestágenos injetáveis apresentam maior risco de desenvolvimento de tumores mamários (HAYDEN; BARNES; JOHNSON, 1989; MISDORP, W., 1991; SKORUPSKI et al., 2005).

Assim como em cadelas, o acometimento das mamas abdominais também é comum em gatas, não sendo raro o envolvimento de múltiplas glândulas (SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013; DE CAMPOS et al., 2014). O tempo médio de sobrevida após a detecção do tumor gira em torno de 12 meses para animais não submetidos a nenhum tipo de tratamento. No entanto, este intervalo pode variar consideravelmente de acordo com o estadiamento clínico e associação à excisão tumoral (HAHN; BRAVO; AVENELL, 1994; GIMÉNEZ et al., 2010; ZAPPULLI et al., 2015).

2.2 ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS

2.2.1 Morfologia

Em seu estudo, Weijer e colaboradores (1972) relataram que características macroscópicas, como o diâmetro e volume tumorais, foram positivamente correlacionadas com a sobrevida em uma análise univariada. No entanto, em estudo posterior, apenas o diâmetro do tumor permaneceu como variável prognóstica independente após análise multivariada (WEIJER; HART, 1983a). Em outro estudo, gatos com tumores mamários maiores de > 3 cm tiveram uma sobrevida média de 5 meses, significativamente menor em comparação aos 9 meses de sobrevida apresentado pelos animais com tumores menores (ITO et al., 1996).

Posteriormente, a classificação do maior diâmetro tumoral entre < 2 cm, 2-3 cm e > 3 cm, medidos no momento da avaliação clínica, demonstrou valor prognóstico em análise univariada de estudo com 64 gatas com carcinoma mamários, porém esse valor estatístico foi perdido em análise multivariada (SEIXAS et al., 2011). (MILLS et al., 2015) encontraram associação entre tamanho tumoral (> 3 cm) e menor sobrevida, assim como a presença de metástase em linfonodo apresentou correlação negativa com a sobrevida. E, recentemente, (SOARES et al., 2016b), mostraram correlação negativa entre sobrevida e parâmetros como tamanho tumoral, presença de necrose e ulceração em análise univariada; porém, após análise

multivariada, apenas o tamanho tumoral se confirmou como variável de valor prognóstico independente para sobrevida, enquanto a presença de ulceração demonstrou valor prognóstico independente para período livre de doença. Por sua vez, De Campos e colaboradores (2016) relataram uma associação positiva entre tamanho tumoral e a presença de ulceração, ou seja, quanto maior o tumor, maior a chance do mesmo apresentar ulceração.

Os tumores mamários em gatos, embora em sua maioria sejam malignos, também podem apresentar histologicamente lesões benignas podem ser observadas. Hiperplasias e displasias, como a hiperplasia fibroepitelial, hiperplasia lobular e ectasia ductal, são exemplos de lesões benignas não neoplásicas (MISDORP, W et al., 1999). No que se refere às neoplasias malignas, os tumores de mama em felinos são predominantemente adenocarcinomas, sendo que os sarcomas e outros tipos não epiteliais ocorrem em baixa frequência. Bem como são comumente classificados como *in-situ* ou carcinomas invasivos, sendo estes divididos, principalmente, em tubulopapilares, cribiformes e sólidos (HAYES; MILNE; MANDELL, 1981; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013). Pode ser encontrado também como o carcinoma mamário inflamatório que tem sido descrito como bastante similar àquele relatado em humanos e caninos (PÉREZ-ALENZA et al., 2004). A classificação dos tumores mamários segue as diretrizes da Organização Mundial da Saúde (OMS), apresentadas no quadro 1 (MISDORP, W et al., 1999).

Quadro 1 - Classificação histopatológica das lesões benignas e malignas no tecido mamário de felinos, de acordo com as diretrizes da Organização Mundial da Saúde

Tumores malignos	Displasias/Hiperplasias mamárias
1-Carcinoma não infiltrativo (in situ)	1-Hiperplasia ductal
2-Carcinoma tubulopapilar	2-Hiperplasia lobular
3-Carcinoma sólido	2.1-Hiperplasia epitelial
4-Carcinoma cribiforme	2.2- Adenose
5-Carcinoma de células escamosas	2.3- Transformação fibroadenomatosa(hipertrofia mamária felina, hipertrofia fibroepitelial)
6-Carcinoma mucinoso	3-Cistos
7-Carcinossarcoma	4-Ectasia ductal
8-Carcinoma ou sarcoma em tumor benigno	5-Fibrose focal (fibroesclerose)
Tumores benignos	
1-Adenoma	
1.1-Adenoma simples	
1.2- Adenoma complexo	
2-Fibroadenoma	
2.1- Fibroadenoma de baixa celularidade	
2.2- Fibroadenoma de alta celularidade	
3-Tumor misto benigno	
4-Papiloma ductal	

Fonte: (MISDORP et al., 1999)

No câncer de mama em mulheres, o tipo histológico, o grau histológico e o envolvimento de linfonodos são fatores prognósticos importantes, sendo assim, carcinomas mamários invasivos são rotineiramente graduados em humanos (VAN DE VIJVER et al., 2002). Embora um grande número de estudos tenham investigado marcadores prognósticos em tumores mamários felinos, na tentativa de gerar análises comparativas com o câncer de mama humano, a falta de padronização metodológica vem dificultando essa comparação (ZAPPULLI et al., 2015).

Os estudos ainda são controversos em relação à sua aplicação da histologia como fator prognóstico em tumores mamários felinos. Em um estudo, os animais diagnosticados com carcinomas tubulopapilares e complexos apresentaram maior sobrevida total quando comparados aos animais com carcinomas sólidos e micropapilares (SEIXAS et al., 2011; MILLS et al., 2015) relataram uma sobrevida mediana de 10 e 8 meses para gatos com carcinomas sólidos ou cribriformes, respectivamente; representando menos da metade do tempo para gatos com carcinomas tubulopapilares (21 meses).

Adicionalmente, Novosad e colaboradores (2006) observaram menor sobrevida total em animais com carcinomas anaplásicos e maior em animais com carcinomas papilares e tubulares. E outros autores também demonstraram menor sobrevida total e menor período livre de doença para animais com carcinoma mamário micropapilar invasivo, tipo histológico este não classificado pela OMS, quando comparados aos outros tipos de carcinomas mamários (SEIXAS et al., 2007). Por outro lado, diversos autores demonstraram que os subtipos morfológicos dos carcinomas mamários em felinos não tiveram valor prognóstico (CASTAGNARO et al., 1998; MISDORP, W et al., 1999; MILLANTA et al., 2002b; SOARES et al., 2016b).

2.2.2 Grau histológico

O método de graduação histológica estabelecido por Elston e Ellis (Sistema de Nottingham) tem sido amplamente utilizado nesta espécie e demonstra grande correlação com o prognóstico (ELSTON, C.W.; ELLIS, 1998; ELLIS et al., 2003). Este mesmo método de classificação pode ser considerado um fator de prognóstico confiável e independente, identificando grupos de gatas com alto risco de desenvolver metástases. Dessa forma, é

indicada a graduação histológica como procedimento usual na avaliação da agressividade dos carcinomas mamários felinos. Foi relatado menor tempo de sobrevida e período livre de doença associado ao grau III, e seu valor prognóstico se demonstrou superior ao tipo histológico para a doença nesta espécie (SEIXAS et al., 2011). Da mesma forma, outros estudos também demonstraram um pior prognóstico em tumores grau III, classificados neste mesmo sistema de graduação. Entretanto, (CASTAGNARO et al., 1998; MATOS et al., 2012) relataram a necessidade de um sistema de graduação histológico padronizado para carcinomas de glândulas mamárias felinas, com uma maior associação com o tempo de sobrevida netes animais.

Neste contexto, (MILLS et al., 2015) propuseram um novo modelo de graduação, considerando aspectos como contagem de mitoses em 10 campos, invasão linfovascular e forma nuclear. Os tumores com ausência de invasão linfovascular, associada a forma nuclear anormal $\leq$ a 5% e uma contagem de mitoses $\leq$ a 62, foram classificados como grau I (carcinoma de baixo grau). Já os tumores com qualquer invasão linfovascular, mais de 5% de forma nuclear anormal ou uma contagem de mitoses cumulativa maior que 62 foram classificados como grau II (carcinoma de grau intermediário). E por fim, se 2 ou todas as características celulares estavam presentes, os tumores foram classificados como grau III (carcinoma de alto grau). Quando os tumores foram classificados usando o novo sistema proposto, foi observada diferença significativa entre os tumores graus I e II, graus II e III, e graus I e III. Os mesmos resultados não foram obtidos pelo Sistema de Nottingham (ELSTON, C. W.; O., 1991). Recentemente, Soares et al. (SOARES et al., 2016b) utilizaram as duas formas de graduação e detectaram diferença estatística apenas com o sistema proposto por (MILLS et al., 2015), em análise univariada. Porém, em análise multivariada, não foi demonstrado o valor prognóstico desta graduação no que se refere à sobrevida global ou período livre de doença.

Quadro 2- Sistema de Nottingham utilizado para a graduação de tumores mamários em mulheres e utilizado nos tumores em gatos

VARIÁVEL		SCORE
Formação tubular	> 75%	1
	10 a 75%	2
	< 10%	3
Pleomorfismo nuclear	Discreto	1
	Moderado	2
	Acentuado	3
Contagem mitótica*	0-8	1
	9-16	2
	> 17	3
SCORE TOTAL		GRAU
3-5		I
6-7		II
8-9		III

Fonte: Adaptado de acordo com o tamanho do campo de microscopia utilizadas neste estudo = 0,55 mm. Elston e Ellis, 1991,1998.

Quadro 3- Novo sistema de graduação proposto para carcinomas mamários invasivos felinos

VARIÁVEL	ESCORE
Invasão Vascular	
Ausente	0
Presente	1
Forma Nuclear*	
≤ 5% anormal	0
> 5% anormal	1
Contagem Mitótica **	
≤ 62	0
> 62	1
ESCORE TOTAL	GRAU
0	I
1	II
2-3	III

Fonte: MILLS et al., 2015

* A forma nuclear anormal inclui qualquer desvio de contorno nuclear liso ou forma nuclear redonda/oval, como fissura, angularidade, ondulação ou ameboide. Morfologia avaliada em grande aumento (objetivas de 40-60x) nas partes menos diferenciadas e/ou invasivas do tumor. O número de núcleos e a exibição da forma nuclear anormal é estimada e expressa como uma porcentagem do número total de núcleos dentro de qualquer campo.

** Número cumulativo de mitoses em 10 campos consecutivos na área mais ativamente proliferativas, com um diâmetro do campo do microscópio de 0,53 mm (objetiva de 40x).

2.3 ESTADIAMENTO CLÍNICO

O estadiamento clínico dos animais com carcinomas mamários baseia-se na classificação TNM, preconizado pela OMS (OWEN; WHO, 1980). Esse sistema consiste nos seguintes critérios principais: 1) tamanho do tumor (T), correspondente ao maior diâmetro do nódulo mamário; 2) envolvimento dos linfonodos regionais (N), comprovados por exame citológico ou histopatológico; e 3) ocorrência de metástase à distância (M). Existem pequenas variações na forma de aplicação deste sistema, principalmente ao que se refere às medidas de tamanho (BORREGO; CARTAGENA; ENGEL, 2009; BURRAI et al., 2010; GIMÉNEZ et al., 2010; SEIXAS et al., 2011; ZAPPULLI et al., 2015); e ainda há controvérsias quanto à quais linfonodos serem avaliados na espécie felina (ZAPPULLI et al., 2015). Desta forma, algumas modificações foram feitas para aplicação do estadiamento clínico em felinos, o qual é apresentado no quadro 4 (CASTAGNARO et al., 1998; MORRIS, 2013; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013).

Quadro 4- Sistema TNM modificado para o estadiamento clínico em felinos.

Estágio Clínico	Diâmetro tumoral (T)	Comprometimento dos Linfonodos Regionais (N)	Metástases Distantes (M)
I	< 2 cm (T ₁)	Negativo (N ₀)	Negativo (M ₀)
II	2 – 3 cm (T ₂)	Negativo (N ₀)	Negativo (M ₀)
III	> 3cm (T ₃)	Negativo ou Positivo (N ₀ ou N ₁)	Negativo (M ₀)
	≤ 3 cm (T ₁ ou T ₂)	Positivo (N ₁)	Negativo (M ₀)
IV	Qualquer T	Qualquer N	Positivo (M ₁)

Fonte: MORRIS et al., 2013

Conforme revisado por Zapulli e colaboradores (2015a), o estadiamento clínico raramente é incluído nas avaliações prognósticas, uma vez que informações como o tamanho do tumor ou a presença de metástases à distância estão muitas vezes indisponíveis. Apesar destas limitações, alguns estudos investigaram a associação entre estadiamento clínico e sobrevida, demonstrando um maior período livre de doença, assim como uma maior sobrevida total, para aqueles animais com estadiamento mais precoce (SEIXAS et al., 2011; HUGHES; DOBSON, 2012). Em uma análise univariada de 53 gatos com tumores mamário, demonstraram que a sobrevida total média destes animais foi inversamente proporcional ao

estadiamento clínico, variando de 1 a 29 meses entre os estádios I a IV (HUGHES; DOBSON, 2012). Esses resultados ressaltam a importância do sistema TNM e sua necessidade de padronização e aplicação em felinos.

2.4 TRATAMENTOS

A possibilidade de diferenciação entre os vários subtipos tumorais nos fornece um importante ganho na determinação do prognóstico mais preciso, que consiste em benefícios não apenas para as gatas e seus tutores, como também para a caracterização de supopulações animais. Estudos tem demonstrado que os tumores mamários em felinos têm mais semelhanças com os tumores mamários humanos do que os modelos em roedores (DE LAS MULAS; REYMUNDO, 2000; DE MARIA et al., 2005). A grande diversidade dos tipos histológicos e comportamento clínico dos tumores mamários reforça a importância de uma abordagem personalizada, uma vez que a conduta terapêutica pode mudar dependendo das características biológicas de cada tumor, variando, por exemplo, entre apenas a excisão cirúrgica sozinha ou sua combinação com protocolos de quimioterapia (SOARES et al., 2016a).

A cirurgia é considerada o método primário de tratamento das neoplasias mamárias em cães e gatos (MORRIS, 2013; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013). Gatas com carcinomas mamários não metastáticos e tratadas apenas pela mastectomia radical (ou bilateral) tiveram período livre de doença mais longo do que aquelas submetidas a cirurgia mais conservadora, representada pela excisão da glândula envolvida no tumor mamario e daquelas imediatamente adjacentes (MACEWEN; WITHROW, 1989). Similarmente, uma análise univariada de 202 gatos com carcinomas domonstrou que o procedimento cirúrgico foi estatisticamente significativo para maior sobrevida total nestes animais, embora esta diferença tenha se perdido na análise multivariada (WEIJER; HART, 1983a). Porém, (MCNEILL et al., 2009) não comprovaram benefício da cirurgia bilateral total em relação ao período livre de doença. Não foi observada diferença significativa na sobrevida ou período livre de doença em animais submetidos à mastectomia bilateral total em comparação à mastectomia unilateral (BORREGO; CARTAGENA; ENGEL, 2009).

No estudo de (CUNHA et al., 2016), o tempo médio de sobrevida de animais tratados exclusivamente com a cirurgia foi de 25,6 meses. A quimioterapia, realizada após a

mastectomia, pode aumentar o tempo de sobrevida ao retardar o aparecimento de possíveis metástases (NOVOSAD, 2003; MCNEILL et al., 2009; DE CAMPOS et al., 2014). Porém, no estudo de Mcneil *et al* (2009) não foi observado diferenças na sobrevida dos animais quando compararam o tratamento cirúrgico exclusivo com a cirurgia associada à quimioterapia.

Os principais protocolos de quimioterapia direcionados ao tumor mamário felino consistem em doxorubicina como um único agente ou na sua combinação com ciclofosfamida; carboplatina como único agente ou em combinação com a doxorubicina; e na associação de mitoxantrona com ciclofosfamida (KITCHELL et al., 2000). Novosad e colaboradores (2006) descrevem um pior prognóstico para animais que foram tratados com menos de 5 aplicações de doxorubicina. Por outro lado, (MCNEILL et al., 2009) não encontraram diferença prognóstica entre os animais que receberam 4 ou 5 aplicações de doxorubicina. Além disso, a doxorubicina pode ser nefrotóxica em gatos, sendo recomendada cuidadosa avaliação da função renal dos animais antes e durante o tratamento (LANA; RUT TEMAN; WITHROW, 2007). Mais estudos são necessários para que sejam alcançadas as doses terapêuticas e as combinações de drogas com maior eficácia no aumento da sobrevida destes animais (GIMÉNEZ et al., 2010).

2.5 MARCADORES MOLECULARES E PROGNÓSTICOS

Para os carcinomas mamários felinos, os tratamentos convencionais como cirurgia, quimioterapia e radioterapia podem não conferir benefícios reais em todos os animais ou em casos mais avançados. Desta forma, vários parâmetros clínicos, patológicos e moleculares têm atraído interesse como fatores prognósticos e/ou preditivos (GIMÉNEZ et al., 2010; ZAPPULLI et al., 2015).

Atualmente, identifica-se na literatura uma série de estudos propondo marcadores imunohistoquímicos como fatores prognósticos nos carcinomas mamários felinos (MILLANTA et al., 2002a; MILLANTA et al., 2005c; MILLANTA et al., 2006b; SOARES et al., 2013; DE CAMPOS et al., 2016; MILLANTA et al., 2016a; SOARES et al., 2016e). Dentre eles, destacam-se o marcador de proliferação celular Ki67 (CASTAGNARO et al., 1998; MILLANTA et al., 2002b; SEIXAS et al., 2011; SOARES et al., 2016b; SOARES et al., 2016d); a enzima ciclooxygenase COX-2 (MILLANTA et al., 2006a; DE CAMPOS et al., 2016; MILLANTA et al., 2016b); o receptor 2 do fator de crescimento epidérmico HER-2

(MILLANTA et al., 2005c; RASOTTO et al., 2011); o fator de crescimento do endotélio vascular VEGF (DE CAMPOS et al., 2016); e os receptores hormonais de estrógeno (MILLANTA et al., 2005b; MILLANTA et al., 2006b; SOARES et al., 2016b) e de progesterona (MILLANTA et al., 2005a; MILLANTA et al., 2006b).

A superexpressão de COX-2 foi significativamente maior em tecidos neoplásicos quando comparada aos tecidos mamários saudáveis. E, embora não tenham sido encontradas correlações entre a superexpressão da COX-2 e característica como idade, tamanho do tumor, grau e invasão linfática, já foi descrita associação a um menor período de sobrevida (MILLANTA et al., 2016b). Para o VEGF, maiores valores de expressão (maior de 72,1%) também se correlacionaram a menor sobrevida total (MILLANTA et al., 2002a). O status de HER-2, por sua vez, não se demonstrou associado ao tipo histológico, graduação do tumor ou invasão linfática; porém, sua positividade se correlacionou a um pior prognóstico, confirmado pela curva de sobrevida (MILLANTA et al., 2005d).

Sabe-se que a detecção e tratamento precoces são fatores chave que influenciam no tempo de sobrevida em pacientes humanos com carcinoma mamário (EDWARDS et al., 2014). Tratamentos mais eficazes se beneficiaram de avanços na subclassificação destes tumores a partir de sistemas baseados em métodos moleculares e marcadores imunofenotípicos (SOARES et al., 2016a). O conhecimento destes fatores tem grande valor no estabelecimento de protocolos terapêuticos, permitindo a individualização e adequação dos mesmos para uma melhor resposta (DE ABREU; KOIFMAN, 2002).

O índice de proliferação Ki67, por exemplo, foi recentemente demonstrado como um biomarcador prognóstico em carcinomas mamários em felinos, especialmente quando apresentam valores superiores a 14%, os quais se correlacionam positivamente com baixa sobrevida global, maior tamanho tumoral, baixa diferenciação, presença de necrose e status negativo para HER-2 e RE (SOARES et al., 2016b; SOARES et al., 2016d).

Além disso, os carcinomas mamários triplo negativos (negativos para os receptores de estrógeno e progesterona, além do HER-2) ganharam particular interesse em medicina humana por apresentarem um subconjunto de neoplasias “basal-like”, freqüentemente associado à mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 (DIAZ et al., 2007). Tais casos podem ser identificados por uma série de marcadores basais específicos, tais como CK5/6, CK17, CK14 e EGFR (RAKHA et al., 2009). Em 2013, Wiese *et al* (2013) realizaram uma tentativa inicial de detecção de alterações gênicas nos carcinomas mamários felinos com o subtipo molecular triplo negativo “basal-like”, a fim de determinar como este perfil pode diferir dos perfis genéticos de tumores de fenótipo similar. Não foram encontradas mutações ou perdas alélicas

nos genes BRCA1 ou BRCA2. Contudo, apenas 5 amostras de DNA puderam ser amplificadas a partir do material fixado em formalina e incluído em parafina. Assim, um maior número de amostras seriam necessárias para uma compreensão mais abrangente do papel das mutações dos genes BRCA neste fenótipo tumoral em felinos.

2.6 SUBTIPOS MOLECULARES

O fenótipo molecular tornou-se importante na definição dos subtipos tumorais, baseando-se na expressão de marcadores imunohistoquímicos, tais como os receptores hormonais de estrogênio (RE) e progesterona (RP), na superexpressão de HER-2, na expressão de citoqueratinas (CK) basais de alto peso molecular (CK 5/6, CK 14 e CK 17) e do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) (HEROLD; ANDERS, 2013). Nos últimos anos, estes marcadores também têm sido utilizados na fenotipagem molecular das neoplasias mamárias em felinos, porém com algumas diferenças nos marcadores, formas de avaliação e sistemas de classificação entre os diferentes grupos de estudo (BRUNETTI et al., 2013; WIESE et al., 2013; MUSCATELLO et al., 2015; SOARES et al., 2016b; SOARES et al., 2016a).

Em 2013, o encontro de especialistas “St. Gallen International Expert Consensus panel” propôs uma classificação molecular para tumores de mama em mulheres, no qual foram estabelecidos seis subtipos biologicamente distintos de câncer de mama: luminal A, luminal B/HER2-negativo, luminal B/HER2-positivo, HER2-positivo (não-luminal), triplo negativo “basal-like” e triplo negativo “normal-like” (GOLDHIRSCH et al., 2013). A expressão de Ki-67 também tem sido utilizada como um fator prognóstico e preditivo da resposta ao tratamento do câncer da mama (LUPORSI et al., 2012). Recentemente, esta classificação foi utilizada na avaliação clínico-patológica de 229 tumores de mama em 102 gatas, conforme os critérios descritos no quadro 5 (SOARES et al., 2016b; SOARES et al., 2016a).

Quadro 5- Classificação molecular dos subtipos de tumores de mama em felinos

	Luminal A	Luminal B		HER-2 positivo	Triplo Negativo	
		HER-2 -	HER-2 +		“Basal-like”	“Normal-like”
RE	+ e/ou RP +	+ e/ou RP +	+ e/ou RP +	-	-	-
RP	+ e/ou RE +	+ e/ou RE +	+ e/ou RE +	-	-	-
HER-2	-	-	+	+	-	-
CK5/6	indiferente	indiferente	indiferente	indiferente	+	-
Ki-67	< 14%	≥ 14%	ns	ns	ns	ns

Fonte: Soares et al. (2016b, 2016c).

ns: não significativo

Em relação aos critérios de positividade estabelecidos o tumor mamário nas gatas foi considerado positivo para RE e/ou RP quando houvesse marcação positiva em mais de 1% das células neoplásicas, de acordo com Escore de Allred. Para HER-2, o tumor foi considerado positivo quando as células neoplásicas apresentassem escores +2 ou +3 de marcação, sendo o primeiro caracterizado por marcação completa da membrana, mesmo que não uniforme ou fraca, mas com distribuição circunferencial óbvia em pelo menos 10% das células; e o segundo caracterizado por marcação intensa e uniforme em pelo menos 10% das células tumorais. Para as CK 5/6 e/ou CK 14, o tumor foi considerado positivo quando houvesse marcação citoplasmática ou membranosa em pelo menos 1% das células neoplásicas. Quanto ao Ki-67, após a contagem das células positivas em 1000 células, o tumor foi considerado com alta proliferação quando demonstrasse índice proliferativo superior a 14% (SOARES et al., 2016b; SOARES et al., 2016a; SOARES et al., 2016d).

No estudo de Soares e colaboradores (2016a), o subtipo mais prevalente foi o luminal B/ HER2-negativo (29,4%), seguido pelo luminal B/HER2-positivo (19,6%), triplo negativo “basal-like” (16,7%), luminal A (14,7%), triplo negativo “normal-like” (12,7%) e HER2-positivo (6,9%). Os autores demonstraram correlação positiva entre os subtipos triplo negativo “basal-like” e “normal-like” com o maior tamanho tumoral e prevalência de áreas de necrose, assim como correlação positiva entre os subtipos luminal B/HER2-positivo, triplo negativo “basal-like” e “normal-like” com os tumores menos diferenciados. No entanto, apesar dos animais com os subtipos luminal A apresentarem maior tempo de sobrevida global e maior tempo livre de doença, e os animais com os subtipos triplo negativo “basal-like”

apresentarem os menores tempos, não houve diferença significativa neste estudo. De Campos e colaboradores (DE CAMPOS et al., 2016) observaram também marcação positiva para receptores hormonais (estrógeno e progesterona) na maioria dos tumores de seu estudo, embora tenham utilizado critérios de classificação gerais com algumas diferenças do estudo anterior. Em oposição aos autores anteriores, (WIESE et al., 2013) relataram que a maioria dos tumores de seu estudo foram classificados como triplo negativos, sendo que 79% destes eram triplo negativos “basal-like”.

Posteriormente, (SOARES et al., 2016b) avaliaram a progressão de 61 animais e, após análise multivariada, os autores demonstraram que a classificação molecular é um fator prognóstico independente para a sobrevida global e que os animais com os subtipos tumorais HER-2 positivo ou triplo negativo “basal-like” apresentaram maior chance de morte em relação aos demais subtipos moleculares. Adicionalmente, alto índice de proliferação celular ($Ki-67 > 14\%$), tamanho tumoral e ulceração também se confirmaram como fatores prognósticos preditores da sobrevida global. Por fim, os autores demonstraram aumento no índice de proliferação celular, superexpressão de HER-2 e surgimento de CK5/6 nas metástases pareadas aos tumores primários, sugerindo a progressão da doença para subtipos moleculares mais agressivos.

Atualmente, um dos fatores determinantes no diagnóstico para estabelecimento do prognóstico do câncer de mama em humanos refere-se à avaliação do status de RE e RP (DE ABREU; KOIFMAN, 2002). Comparativamente, os felinos parecem exibir diferentes tendências nesse status, uma vez que apresentam uma alta porcentagem de tumores mamários negativos para ER. Isto sugere, então, que estes tumores podem ser modelos apropriados para estágios avançados do câncer de mama ER negativos em mulheres (MILLANTA et al., 2005a; ZAPPULLI et al., 2005). A investigação de potenciais novos marcadores moleculares fornece informações relevantes para o manejo clínico e compreensão da patogênese neoplásica, podendo ter implicações na utilização de tumores mamários felinos como modelos espontâneos para a doença humana (HUGHES; DOBSON, 2012).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o valor prognóstico de parâmetros clínico-patológicos e dos subtipos moleculares no carcinoma mamário em felinos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Avaliar os aspectos clínico-epidemiológicos e patológicos dos carcinomas de mama em felinos e sua associação com a sobrevida global;

3.2.2 Classificar os tumores de mama felinos em subtipos moleculares, correlacionando-os com a sobrevida global;

3.2.3 Determinar o valor prognóstico de parâmetros clínico-epidemiológicos, histopatológicos e moleculares nos carcinomas de mama nesta casuística de felinos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Patologia Morfologia e Molecular (LAPMOL), localizado no Departamento de Patologia (VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP).

4.1 CASUÍSTICA

Foram analisados 65 tumores provenientes de 42 gatas, as quais foram atendidas em Hospitais Veterinários Públicos e Particulares. Deste total, 31 animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de mastectomia no Serviço de Cirurgia do Hospital Veterinário Público de São Paulo (ANCLIVEPA-SP), no período compreendido entre os anos de 2013 e 2015. Os blocos de parafina destes animais foram obtidos, retrospectivamente, no arquivo do Hospital Veterinário Público de São Paulo para a confecção de novas lâminas histológicas. Os dados clínicos e epidemiológicos desta população foram obtidos juntamente aos prontuários de cada animal, incluindo a busca de diversos parâmetros, tais como: idade, raça, tamanho da lesão, presença de ulceração, estado reprodutivo, uso de anticoncepcionais e tratamentos quimioterápicos neoadjuvantes. Adicionalmente, foi realizado o acompanhamento clínico para avaliação da sobrevida através de acompanhamento “online” dos prontuários e contato telefônico com os tutores responsáveis pelos animais. Aqueles animais cujos tutores estiveram inacessíveis e/ou as informações necessárias não foram obtidas, foram censurados da análise de sobrevida.

Adicionalmente, foi realizada a coleta prospectiva de material biológico em 11 animais com tumores mamários, os quais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de mastectomia no Hospital Veterinário Público de São Paulo (ANCLIVEPA-SP), no Hospital Veterinário da Faculdades Metropolitanas Unidas (FMU) ou na Clínica Veterinária Onco Cane. Antes das coletas, os tutores foram informados sobre o estudo através de explicações sobre os objetivos do projeto, assim como pela leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecimento (TCLE), previamente aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade

de São Paulo (protocolo CEUA nº 4291070715). Imediatamente após a mastectomia, as formações tumorais destes animais foram fotografadas e o diâmetro maior de cada lesão foi mensurada com o auxílio de um paquímetro digital. Fragmentos representativos de todas as nodulações observadas, assim como das margens e linfonodos (inguinais e/ou axilares), foram coletados e fixados em solução de formol tamponado a 10% durante 24 horas. Os dados clínico-epidemiológicos e de sobrevida desta população foram obtidos juntamente aos tutores e médicos veterinários responsáveis, os quais foram acompanhados até o fechamento deste trabalho (*follow-up* mínimo de 3 meses). O tempo de sobrevida foi calculado em dias e considerou o período entre a data da cirurgia até o óbito relacionado à doença.

4.2 PARÂMETROS CLÍNICOS

Informações de parâmetros clínicos como: presença de metástase em linfonodo regional, presença de ulceração, tumores únicos ou múltiplos, uso de anticoncepcional e tamanho dos tumores foram obtidas a partir dos prontuários dos animais para os casos retrospectivos. E para os casos prospectivos foram obtidas no momento da coleta e durante as análises. No que concerne ao tamanho tumoral (T), este parâmetro foi considerado como o diâmetro máximo do tumor primário, sendo agrupado em *i)* T1- menor que 2 cm; *ii)* T2- compreendido entre 2 e 3 cm e *iii)* T3- superior a 3 cm.

4.3 AVALIAÇÃO HISTOPALÓGICA

Os fragmentos do tecido tumoral, margens e linfonodos fixados em solução de formol tamponado a 10% foram processados histologicamente e incluídos em parafina. Cortes de 5µm de cada amostra foram corados pelas técnicas de Hematoxilina e Eosina (HE), para a avaliação histológica. A avaliação histopatológica foi realizada de acordo com os critérios propostos pela Organização Mundial de Saúde (MISDORP, W et al., 1999) e a graduação histológica foi realizada segundo a classificação de (ELSTON, C. W.; O., 1991). No caso de animais com tumores múltiplos, todos os nódulos foram analisados e classificados

separadamente. Nos tumores com mais de um padrão histopatológico no mesmo nódulo, foi considerado o subtipo mais predominante para a classificação final.

4.4 AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

Para a realização do procedimento de imuno-histoquímica, foram realizados cortes histológicos de 5µm de espessura nas amostras de pelo menos um tumor nos 42 animais selecionados. Os cortes histológicos foram desparafinizados, hidratados e submetidos ao desmascaramento antigênico em panela de pressão elétrica durante 20 minutos, utilizando solução tampão citrato (pH 6,0). Posteriormente, as lâminas foram submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena em solução de H₂O₂ 6% por 30 minutos, protegido da luz. Após lavagens em água corrente, água destilada e em tampão de lavagem TBS, foi realizado o bloqueio de proteína com Protein Block (reagente Kit Spring – Cod SPD-125), durante 10 minutos e estufa entre 20 e 25°C. As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários específicos (Tabela 1), diluídos em diluente de anticorpo (Spring Cód – ADS 125), pelo período de 60 minutos e em estufa mantida entre 20 e 25°C. Após incubação, as lâminas foram lavadas com tampão de lavagem em pisseta e iniciado o sistema de visualização por polímero. Primeiramente foi aplicado o Polímero Reveal HRP (Spring – Cód SPD 125), por 10 minutos em temperatura de 20 a 25°C. Após, o reagente HRP Conjugate HRP (Spring – Cód SPD 125) foi aplicado por 15 minutos em temperatura de 20 a 25°C. A seguir, as lâminas foram reveladas pelo cromógeno tetracloreto de 3-3' diaminobenzidina (DAB) (reagente Kit Spring – Cód SPD 125) por 5 minutos e em temperatura ambiente. Após lavagens em água corrente e destilada, as lâminas foram contra coradas em Hematoxilina de Harris, lavadas em água corrente e destilada e realizados 2 banhos rápidos em água amoniacal (0,5%). Por fim, as lâminas foram lavadas e submetidas à bateria de desidratação. Para montagem, foram utilizadas lamínulas coladas por *PermOUNT* (ThermoFischer). Todas as reações foram acompanhadas de tecidos para o controle positivo de cada anticorpo. O controle negativo foi obtido pela omissão do anticorpo primário da reação.

Tabela 1- Condições e reagentes padronizados para as reações de imuno-histoquímica em tecido de felinos. São Paulo, 2017.

Marcador	Marca	Clone	Condições do desmascaramento	Diluição do anticorpo	Tecido controle*
RE	Leica	6F11	Panela de pressão elétrica, 125°C, 20 min. Tampão Citrato (pH 6,0).	1:500	Útero
RP	Santa Cruz	C-19	Panela de pressão elétrica, 125°C, 20 min. Tampão Citrato (pH 6,0).	1:2000	Útero
HER-2	Dako	-	Panela de pressão elétrica, 125°C, 20 min. Tampão Citrato (pH 6,0).	1:200	Tumor de Mama
Ki-67	Dako	MIB-1	Panela de pressão elétrica, 125°C, 20 min. Tampão Citrato (pH 6,0).	1:2000	Linfonodo
CK5/6	Leica	XM26	Panela de pressão elétrica, 125°C, 20 min. Tampão Citrato (pH 6,0).	1:100	Pele

RE: Receptor de estrógeno; RP: receptor de progesterona; HER-2: fator de crescimento epidérmico-2; CK: citoqueratina. *Tecido controle positivo de felinos.

A avaliação semiquantitativa da imunohistoquímica foi realizada segundo os critérios propostos por, no qual o tumor foi considerado positivo para receptor de estrógeno (RE) e/ou receptor de progesterona (RP) quando houvesse marcação em pelo menos 1% das células neoplásicas, com intensidade média ou forte (SOARES et al., 2016b; SOARES et al., 2016a; SOARES et al., 2016e). Para HER-2, o tumor foi considerado positivo quando as células neoplásicas apresentassem escores +2 ou +3 de marcação, sendo o primeiro caracterizado por marcação completa da membrana, mesmo que não uniforme ou fraca, com distribuição em pelo menos 10% das células; e o segundo caracterizado por marcação intensa e uniforme em pelo menos 10% das células invasivas do tumor. Para as CK5/6, o tumor foi considerado positivo quando houvesse marcação citoplasmática ou membranosa em pelo menos 1% das células neoplásicas. Quanto ao Ki-67, o tumor foi considerado com alta proliferação no caso de positividade em mais de 14% das células, as quais foram contadas as células marcadas em um total de 1000 células (objetiva de 100x). Baseado nos resultados destes marcadores moleculares, os subtipos tumorais foram classificados de acordo com os critérios estabelecidos por Soares e colaboradores e apresentados no quadro 5 (SOARES et al., 2016b; SOARES et al., 2016a).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Considerou-se para análise os diferentes tipos histológicos tumorais para cada animal. Dessa forma, quando havia mais de um tumor do mesmo tipo histológico por paciente, selecionou-se apenas aquele ulcerado e de maior volume tumoral. Animais com mortes ocasionadas por outros fatores, que não o tumor mamário, foram excluídos da análise.

Os gráficos de Kaplan-Meier foram elaborados para cada variável e a correlação desta com a sobrevida foi analisada pelo teste de Log-rank para uma significância de 5%. A análise de cada estrato de uma variável foi realizada através de um modelo de risco proporcional de COX.

No caso de variáveis quantitativas, como a idade e volume tumoral, decidiu-se estabelecer um ponto de corte para a divisão de dois estratos de cada uma das variáveis. A idade e o volume tumoral foram divididos em abaixo ou acima da mediana (12 anos para idade e 8cm³ para o volume tumoral). No caso do Ki67, adotou-se a referência de 14%, conforme preconizado por (SOARES et al., 2016d).

Foi utilizado o software R (*The R Foundation for Statistical Computing*) versão 3.3.2. Para a análise de sobrevida foi utilizada a biblioteca *survival* (THERNEAU; GRAMBSCH, 2000) e para os gráficos de Kaplan-Meier as bibliotecas *ggplot2* (WICKHAM, 2010) e *ggfortify* (TANG; HORIKOSHI; LI, 2016).

5. RESULTADOS

As raças representadas neste estudo foram gatas sem raça definida ($n = 30$), siamêses ($n = 10$) e persas ($n = 2$). A média de idade foi de $12,29 \pm 2,87$ anos e a mediana de 12 anos (variando de 6 a 18 anos). Vinte e um (50%) animais estavam situados na faixa etária maior de 12 anos. Todos os animais eram fêmeas. Vinte e nove (69%) gatas eram castradas no momento da cirurgia e tutores de 11 (26,2%) animais relataram uso de anticoncepcional para os mesmos. Vinte e cinco (59,5%) animais apresentaram tumores únicos (Figura 1), enquanto 17 (40,5%) apresentaram tumores múltiplos. A metástase em linfonodo regional esteve presente em 16 gatas (38,1%) (Figura 2), sendo que esta informação não foi obtida em 15 (35,7%) animais. Todas as gatas deste estudo foram submetidas à mastectomia unilateral ou bilateral total e o tratamento quimioterápico foi realizado em 9 (21,4%) gatas (Tabela 2). O protocolo quimioterápico variou entre os animais, sendo ainda descontinuado para alguns deles.

Do total de 42 animais, foram obtidas informações sobre 65 tumores mamários. Deste total, 25 (38,5%) tumores apresentaram tamanho maior de 3 cm no momento da cirurgia. Dados relativos à presença de ulceração foram obtidos em 48 tumores, dos quais 20 (41,7%) apresentavam-se ulcerados (Figura 1). O exame histopatológico foi realizado em 50 tumores, sendo que o subtipo histológico do carcinoma tubulopapilar (Figura 3) foi detectado em 19 (38%) deles, seguido pelo carcinoma sólido (Figura 4) em 13 (26%), cribiforme (figura 5) em 10 (20%), carcinoma em tumor benigno em 5 (10%), carcinoma *in situ* em 2 tumores (4%) e um caso (2%) de carcinoma mucinoso.

Dos 50 tumores analisados, o grau histológico foi avaliado em 48 tumores, uma vez que os carcinomas *in situ* não são graduados. Destes, o grau II foi detectado em 25 (52,1%) tumores, sendo a maior ocorrência. Também foram avaliados os subtipos moleculares em 48 tumores, utilizando marcadores imuno-histoquímicos, dos quais 31 (64,5%) tumores foram caracterizados como triplo negativo, sendo 17 (35,4%) triplo negativos “normal-like” e 14 (29,1%) triplo negativos “basal-like”.

Em seguida, o subtipo molecular HER-2 positivo foi representado em 12 (25%) tumores. Os subtipos luminais A e B representaram um total de 5 animais (10,5%) (Figura 6). O marcador de proliferação celular Ki67 também foi analisado separadamente, utilizando-se o cutoff de 14% estabelecido por (SOARES et al., 2016e). Neste marcador, a maioria dos tumores (89,6%) apresentou valores iguais ou maiores do que 14% (Tabela 3).

Tabela 2- Características clínicas das 42 gatas incluídas no estudo. São Paulo, 2017.

Variável clínica	Total (n=42)
Idade (anos)	
média ± DP	12,29±2,87
Idade por grupo	
< 8 anos	1 (2,4%)
8-12 anos	20 (47,6%)
> 12 anos	21 (50%)
Raça	
Siamês	10 (23,8%)
Persa	2 (4,8%)
SRD	30 (71,4%)
Status Reprodutivo	
Castrada	29 (69%)
Inteira	7 (16,7%)
Sem informação	6 (14,3%)
Uso de anticoncepcional	
Sim	11 (26,2%)
Não	18 (42,9%)
Sem informação	13 (30,9%)
Tumores Múltiplos	
Sim	17 (40,5%)
Não	25 (59,5%)
Metástase em linfonodo regional	
Sim	16 (38,1%)
Não	11 (26,2%)
Sem informação	15 (35,7%)
Tratamento	
Apenas mastectomia	33 (78,6%)
Mastectomia + quimioterapia	9 (21,4%)

Fonte: GOVONI, 2017.

DP: Desvio Padrão.

Tabela 3- Características clínico-patológicas dos 65 tumores provenientes de 42 gatas.

Variáveis clínico-patológicas	Total de tumores
Tamanho	n=65
< 2 cm (T1)	24 (36,9%)
2-3 cm (T2)	16 (24,6%)
> 3 cm (T3)	25 (38,5%)
Ulceração	n=48
Sim	20 (41,7%)
Não	28 (58,3%)
Tipo histológico	n=50
Carcinoma in situ	2 (4%)
Carcinoma em tumor benigno	5 (10%)
Carcinoma tubulopapilar	19 (38%)
Carcinoma cribiforme	10 (20%)
Carcinoma mucinoso	1 (2%)
Carcinoma sólido	13 (26%)
Grau	n=48
I	13 (27,1%)
II	25 (52,1%)
III	10 (20,8%)
Ki67	n= 48
≥ 14%	43 (89,6%)
< 14%	5 (10,4%)
Subtipo molecular	n=48
Luminal A	2 (4,2%)
Luminal B HER-2 negativo	1 (2,1%)
Luminal B HER-2 positivo	2 (4,2%)
HER-2 positivo não luminal	12 (25%)
Triplo negativo "normal-like"	17 (35,4%)
Triplo negativo "basal-like"	14 (29,1%)

Fonte: GOVONI, 2017.

T: tamanho.

Tabela 4- Características clínico-patológicas e moleculares dos animais e tumores. São Paulo, 2017.

Gata	Êtado	Idade (anos)	Raça	Status Reprodutivo	Útero ou múltiplo	Volume	Tamanho (T)	Uteração	Metástase em linfonodo regional	Tratamento	Uso de anticoncepcional	Tipo Histológico	Grav	Subtipo molecular	K67 (%)	Sobrevivência (dias)
1	Retrospectivo	14	SRD	castrada	único	2,93 cm³	T1	não	SI	mastectomia	SI	Carcinoma sólido	III	HER-2 positivo	20,98	120
2	Retrospectivo	17	Siamesês	castrada	múltiplo	0,75 cm³ 6 cm³	T1 T2	sim	SI	mastectomia	SI	Carcinoma cribriforme	I	Tripla negativo "normal-like"	23,2	135
3	Retrospectivo	11	SRD	castrada	único	105 cm³	T3	não	SI	mastectomia + Q	SI	Carcinoma cribriforme	II	Tripla negativo "normal-like"	27,2	180
4	Retrospectivo	18	SRD	castrada	múltiplo	4,81 cm³ 54 cm³	T3 T3	sim	SI	mastectomia	SI	Carcinoma tubulopapilar	I	HER-2 positivo	13,37	90
5	Retrospectivo	13	Siamesês	castrada	múltiplo	60,75 cm³ 5 cm³	T3 T2	sim	Sim	mastectomia	SI	Carcinoma em tumor benigno	I	Luminal A	7,53	30
6	Retrospectivo	16	SRD	castrada	único	4 cm³	T2	Sim	SI	mastectomia + Q	Sim	Carcinoma tubulopapilar	II	Tripla negativo "basal-like"	32,81	60
7	Retrospectivo	9	SRD	castrada	único	8 cm³	T2	SI	Sim	mastectomia + Q	Sim	Carcinoma mucinoso	I	Tripla negativo "basal-like"	22,46	880
8	Retrospectivo	14	SRD	SI	múltiplo	0,13 cm³ 0,13 cm³	T1 T1	SI	SI	mastectomia + Q	SI	Carcinoma em tumor benigno	I	Tripla negativo "basal-like"	25,36	365
9	Retrospectivo	10	SRD	SI	múltiplo	0,13 cm³ 6 cm³	T1 T2	SI	Sim	mastectomia + Q	não	Carcinoma cribriforme	I	HER-2 positivo	19,33	365
10	Retrospectivo	14	Siamesês	SI	único	9 cm³	T2	não	não	mastectomia	não	Carcinoma em tumor benigno	I	HER-2 positivo	16,54	15 (morte não relacionada à doença)
11	Retrospectivo	10	SRD	castrada	único	6 cm³	T3	sim	SI	mastectomia	SI	Carcinoma cribriforme	II	Luminal A	26,38	75
12	Retrospectivo	12	SRD	SI	único	1 cm³	T1	SI	não	mastectomia	SI	Carcinoma cribriforme	I	Tripla negativo "basal-like"	33,94	105
13	Retrospectivo	13	SRD	castrada	múltiplo	3,38 cm³ 1 cm³	T1 T1	não	não	mastectomia + Q	não	Carcinoma tubulopapilar	I	Tripla negativo "normal-like"	32,12	270
14	Retrospectivo	10	SRD	castrada	múltiplo	0,75 cm³ 1 cm³	T1 T1	SI	Sim	mastectomia + Q	não	Carcinoma tubulopapilar	I	Tripla negativo "basal-like"	28,23	180
15	Retrospectivo	8	SRD	castrada	único	24 cm³	T3	SI	não	mastectomia	não	Carcinoma sólido	II	Tripla negativo "basal-like"	27,35	880 (morte não relacionada à doença)
16	Retrospectivo	9	SRD	castrada	múltiplo	0,03 cm³	T2	SI	Sim	mastectomia	não	Carcinoma tubulopapilar	I	Tripla negativo "basal-like"	9,96	395
17	Retrospectivo	13	SRD	castrada	único	36 cm³	T3	SI	SI	mastectomia + Q	não	Carcinoma cribriforme	II	HER-2 positivo	26,66	60
18	Retrospectivo	11	SRD	íntera	único	12 cm³	T2	sim	não	mastectomia	Sim	Carcinoma tubulopapilar	I	Tripla negativo "normal-like"	22,49	120
19	Retrospectivo	8	SRD	SI	múltiplo	1 cm³	T2	SI	Sim	mastectomia	não	Carcinoma sólido	II	HER-2 positivo	14,29	Viva (1155 dias após a cirurgia)
20	Retrospectivo	8	SRD	castrada	único	60 cm³	T3	sim	SI	mastectomia	não	Carcinoma sólido	II	Tripla negativo "normal-like"	40,93	60
21	Retrospectivo	14	SRD	castrada	único	7,5 cm³	T2	SI	sim	mastectomia	Sim	Carcinoma sólido	II	Tripla negativo "basal-like"	30,78	60
22	Retrospectivo	15	SRD	castrada	único	39,38 cm³	T3	sim	sim	mastectomia + Q	sim	Carcinoma tubulopapilar	II	Tripla negativo "normal-like"	25,43	180
23	Retrospectivo	17	Siamesês	castrada	único	67,5 cm³	T3	sim	SI	mastectomia	SI	Carcinoma sólido	III	Tripla negativo "normal-like"	30,1	2 (morte não relacionada à doença)
24	Retrospectivo	10	SRD	castrada	único	130,05 cm³	T3	não	não	mastectomia	sim	Carcinoma tubulopapilar	I	Tripla negativo "normal-like"	30,05	545
25	Retrospectivo	11	SRD	castrada	único	20 cm³	T3	sim	SI	mastectomia	Sim	Carcinoma sólido	III	Tripla negativo "basal-like"	27,92	30
26	Retrospectivo	11	SRD	SI	único	1 cm³	T1	SI	não	mastectomia	SI	Carcinoma in situ	x	Luminal B HER-2 positivo	12,28	20 (morte não relacionada à doença)
27	Retrospectivo	17	Siamesês	castrada	múltiplo	7,5 cm³ 13,5 cm³	T2 T2	sim	SI	mastectomia	Sim	Carcinoma sólido	III	HER-2 positivo	45,71	60
28	Retrospectivo	13	SRD	castrada	múltiplo	17,5 cm³	T3	sim	SI	mastectomia	SI	Carcinoma em tumor benigno	I	Tripla negativo "basal-like"	26,3	365
29	Retrospectivo	6	Siamesês	castrada	único	18,2 cm³	T3	não	SI	mastectomia	SI	Carcinoma tubulopapilar	I	Tripla negativo "normal-like"	20,29	30
30	Retrospectivo	9	SRD	castrada	único	28,56 cm³	T3	sim	SI	mastectomia	SI	Carcinoma tubulopapilar	III	Tripla negativo "basal-like"	28,46	240
31	Retrospectivo	10	Siamesês	castrada	único	30 cm³	T3	sim	SI	mastectomia	Sim	Carcinoma sólido	II	Tripla negativo "normal-like"	28,8	515 (morte de 2016)
32	Prospectivo	13	Persa	íntera	único	64 cm³	T3	não	sim	mastectomia	não	Carcinoma cribriforme	III	HER-2 positivo	14	150 (morte por doença renal - causa não relacionada)
33	Prospectivo	12	SRD	castrada	único	3,38 cm³	T1	não	não	mastectomia	não	Carcinoma cribriforme	II	HER-2 positivo	35	Viva (330 dias após a cirurgia)
34	Prospectivo	13	SRD	castrada	único	64 cm³	T3	não	não	mastectomia	não	Carcinoma cribriforme	II	Tripla negativo "normal-like"	19,2	3 (morte não relacionada à doença)
35	Prospectivo	12	SRD	íntera	múltiplo	8 cm³ 125 cm³	T2 T3	não	Sim	mastectomia	não	Carcinoma sólido	III	HER-2 positivo	58,2	150
36	Prospectivo	11	SRD	castrada	múltiplo	3,38 cm³ 1 cm³	T1 T1	não	Sim	mastectomia	Sim	Carcinoma sólido	II	HER-2 positivo	41,5	Viva (330 dias após a cirurgia)
37	Prospectivo	11	Persa	íntera	múltiplo	1 cm³	T1	não	não	mastectomia	não	Carcinoma tubulopapilar	II	Luminal B HER-2 positivo	36,33	Viva (240 dias após a cirurgia)
38	Prospectivo	15	SRD	castrada	único	6 cm³	T2	sim	Sim	mastectomia	não	Carcinoma tubulopapilar	II	Tripla negativo "normal-like"	50	Viva (240 dias após a cirurgia)
39	Prospectivo	13	SRD	íntera	único	100 cm³	T3	sim	não	mastectomia	não	Carcinoma tubulopapilar	II	Tripla negativo "basal-like"	44,05	120
40	Prospectivo	17	Siamesês	castrada	múltiplo	56 cm³ 3,38 cm³	T3 T3	não	Sim	mastectomia	não	Carcinoma sólido	III	Tripla negativo "normal-like"	30,88	Viva (180 dias após a cirurgia)
41	Prospectivo	13	SRD	íntera	múltiplo	1,73 cm³ 0,86 cm³ 0,34 cm³	T1 T1 T1	não	Sim	mastectomia	Sim	Carcinoma tubulopapilar	III	Luminal B Her-2 negativo	38,52	Viva (120 dias após a cirurgia)
42	Prospectivo	15	Siamesês	íntera	múltiplo	39,55 cm³ 133,63 cm³ 2,03 cm³ 3,84 cm³ 15,55 cm³	T3 T3 T1 T1 T2	sim	Sim	mastectomia	não	Carcinoma sólido Carcinoma in situ (padrão micropapilar)	III	Tripla negativo "basal-like"	58,61	(sem sobrevivência)

Fonte: GOVONI, 2017

Q=Quimioterapia; Tamanho (T)=classificação de tamanho de acordo com intervalos do sistema TNM para gatas (MORRIS,2013): T1 (<2cm); T2 (2-3cm); T3 (>3cm); SI=sem

Figura 1- Fotomacrografia de formação tumoral após cirurgia de mastectomia bilateral (coleta prospectiva).

Fonte: GOVONI, 2017

A) Formação tumoral ulcerada, antes da remoção cirúrgica das cadeias mamárias. B) Corte transversal da formação tumoral, evidenciando extensas áreas de necrose e hemorragias centrais.

Figura 2- Fotomacrografia e fotomicrografia da metástase em linfonodo regional.

Fonte: GOVONI, 2017

A) Metástase em linfonodo axilar de carcinoma mamário sólido grau III. B) Metástase em linfonodo axilar de carcinoma mamário sólido grau III (400x). Coloração HE.

Fotomicrografias ilustrativas dos 3 tipos histológicos mais prevalentes neste estudo:

Figura 3- Fotomicrografia de carcinoma mamário tubulopapilar.

Fonte: GOVONI, 2017.
Coloração HE (400x).

Figura 4- Fotomicrografia de carcinoma mamário sólido.

Fonte: GOVONI, 2017.
Coloração HE (400x).

Figura 5- Fotomicrografia de carcinoma mamário cribiforme.

Fonte: GOVONI, 2017
Coloração HE (400x).

Figura 6- Fotomicrografias ilustrativas de painel molecular de tumor mamário em felinos

Fonte: GOVONI, 2017

Exemplo de subtipo molecular Luminal B HER-2 positivo. A) Marcação positiva para RE (400x). B) Marcação positiva para RP (400x). C) Marcação positiva para superexpressão de HER-2 (400x). D) Marcação positiva para CK 5/6 (400x). E) Marcação de Ki67 (400x). F) Coloração HE; carcinoma mamário tubulopapilar (400x).

Dos 65 tumores avaliados no presente estudo, 7 foram excluídos por pertencerem a animais sem informação de sobrevida ou animais de morte não relacionada à doença. Ainda, para animais com múltiplos tumores de mesmo tipo histológico, foi considerado aquele que apresentou ulceração; e quando todos os tumores eram semelhantes quanto a presença de ulceração, foi considerado o tumor de maior volume. Assim, 39 tumores foram utilizados para as análises de valor prognóstico para cada variável.

Houve diferença estatisticamente significativa entre sobrevida e a idade dos animais (Tabela 5). Sendo 12 anos a mediana das amostras, os animais foram divididos em ≤ 12 anos e > 12 anos, e os animais deste último grupo apresentaram menor tempo de sobrevida (Figura 7).

Tabela 5- Correlação entre a idade das gatas acometidas pelo carcinoma mamário, associada a sobrevida, pelo teste estatístico de Log-rank. São Paulo, 2017.

IDADE	Valor de p	Tumores	Mortes	Mortalidade	Mediana
≤ 12 anos	1	21	14	66,67%	NA
> 12 anos	0,0043	18	15	83,33%	365
Log-rank	0,0036				
Há diferença significativa entre os estratos?	SIM				

Figura 7- Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos animais estudados em função da idade

Em relação à raça, não houve diferença significativa com a sobrevida dos animais (Tabela 6; Figura 8).

Tabela 6- Correlação entre as raças acometidas pelo carcinoma mamário, associada a sobrevida, pelo teste estatístico de Log-rank. São Paulo, 2017.

RAÇA	Valor de p	Tumores	Mortes	Mortalidade	Mediana
SRD	1	30	24	80,00%	880
Siamês	0,53	8	5	62,50%	NA
Persa	1	1	0	0,00%	NA
Log-rank	0,575				
Há diferença significativa entre os estratos?	NÃO				

Figura 8- Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos animais estudados em função da raça

Para correlação dos parâmetros clínicos de status reprodutivo e uso de anticoncepcional, foram considerados apenas aqueles animais dos quais se obteve tais informações. Não houve diferença estatisticamente significativa entre sobrevida e o fato dos animais já serem ou não castrados ao momento da cirurgia (Tabela 7; Figura 9). Da mesma forma, não foi observada diferença em relação a sobrevida para o histórico de administração de anticoncepcionais nestes pacientes (Tabela 8; Figura 10).

Tabela 7- Correlação para o status reprodutivo dos animais acometidos pelo carcinoma mamário felino, associada a sobrevida, pelo teste estatístico de Log-rank. São Paulo, 2017.

STATUS REPRODUTIVO	Valor de p	Tumores	Mortes	Mortalidade	Mediana
Inteira	1	5	3	60,00%	NA
Castrada	0,4	29	22	75,86%	880
Log-rank	0,394				
Há diferença significativa entre os estratos?	NÃO				

Figura 9- Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos animais estudados em função do status reprodutivo

Tabela 8- Correlação para o uso de anticoncepcionais, associado a sobrevida, para os animais acometidos pelo carcinoma mamário felino, pelo teste estatístico de Log-rank. São Paulo, 2017

ANTICONCEPCIONAL	Valor de p	Tumores	Mortes	Mortalidade	Mediana
Sem uso	1	16	9	56,25%	NA
Anticoncepcional	0,38	11	8	72,73%	880
Log-rank	0,372				
Há diferença significativa entre os estratos?	NÃO				

Figura 10- Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos animais estudados em função do uso de anticoncepcional

O tratamento instituído para os animais foi a mastectomia isolada ou associada à quimioterapia. O protocolo quimioterápico utilizado variou para os animais que receberam a quimioterapia, sendo que para a maioria deles foi utilizada doxorrubicina, carboplatina ou ambos. O número de aplicações também teve grande variação entre os animais. No entanto, animais tratados apenas com mastectomia e aqueles tratados com mastectomia associada a quimioterapia não obtiveram tempo de sobrevida estatisticamente diferente (Tabela 9; Figura 11).

Tabela 9- Correlação entre os tipos de tratamento instituídos, associados à sobrevida, para os animais acometidos pelo carcinoma mamário felino, pelo teste estatístico de Log-rank. São Paulo, 2017

TRATAMENTO	Valor de p	Tumores	Mortes	Mortalidade	Mediana
Mastectomia	1	28	18	64,29%	NA
Mastectomia + quimioterapia	0,4	11	11	100,00%	365
Log-rank	0,41				
Há diferença significativa entre os estratos?	NÃO				

Figura 11- Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos animais estudados em função do tratamento instituído

No que se refere às características anatomopatológicas dos tumores, estes foram classificados para tamanho de acordo com o estadiamento proposto por MORRIS (2013). Embora a taxa de mortalidade relacionada a tumores com maior tamanho (T3) tenha sido maior quando comparada aos tamanhos menores, não houve diferença estatisticamente significativa para estes grupos em relação a sobrevida (Tabela 10; Figura 12).

Tabela 10- Correlação entre os diferentes tamanhos (estadiamento de MORRIS, 2013), associados à sobrevida, para os animais acometidos pelo carcinoma mamário felino, pelo teste estatístico de Log-rank. São Paulo, 2017

TAMANHO	Valor de p	Tumores	Mortes	Mortalidade	Mediana
T1	1	11	7	63,64%	365
T2	0,5	9	7	77,78%	880
T3	0,58	19	15	78,95%	545
Log-rank	0,357				
Há diferença significativa entre os estratos?	NÃO				

Figura 12- Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos animais estudados em função do tamanho tumoral (de acordo com o estadiamento de MORRIS, (2013))

O volume tumoral (em cm^3) também foi avaliado quanto ao seu valor prognóstico e também não foi encontrada diferença estatisticamente significante para esta variável (Tabela 11; Figura 13).

Tabela 11- Correlação entre os diferentes volumes, associados à sobrevida, para os animais acometidos pelo carcinoma mamário felino, pelo teste estatístico de Log-rank. São Paulo, 2017

VOLUME (Cm3)	Valor de p	Tumores	Mortes	Mortalidade	Mediana
[0,8)	1	20	14	70,00%	880
[8,400)	0,22	19	15	78,95%	545
Log-rank	0,212				
Há diferença significativa entre os estratos?	NÃO				

Figura 13- Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos animais estudados em função do volume tumoral.

A presença de ulceração no tumor se demonstrou como uma variável estatisticamente significativa para sobrevida, sendo que os animais com tumores ulcerados tiveram menor sobrevida em relação aos animais com tumores não ulcerados (Tabela 12; Figura 14).

Tabela 12- Correlação entre a presença de ulceração ou não, associados à sobrevida, para os animais acometidos pelo carcinoma mamário felino, pelo teste estatístico de Log-rank. São Paulo, 2017

ULCERAÇÃO	Valor de p	Tumores	Mortes	Mortalidade	Mediana
Não ulcerado	1	10	5	50,00%	NA
Ulcerado	0,022	17	14	82,35%	365
Log-rank	0,0139				
Há diferença significativa entre os estratos?	SIM				

Figura 14- Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos animais estudados em função da presença de ulceração.

O fato dos animais apresentarem tumores únicos ou múltiplos não acarretou em diferença estatisticamente significativa para a sobrevida (Tabela 13, figura 15).

Tabela 13- Correlação entre o fato dos tumores serem únicos ou múltiplos e a sobrevida, para os animais acometidos pelo carcinoma mamário felino, pelo teste estatístico de Log-rank. São Paulo, 2017

MULTIPLICIDADE	Valor de p	Tumores	Mortes	Mortalidade	Mediana
Único	1	19	13	68,42%	395
Múltiplo	0,46	20	16	80,00%	880
Log-rank	0,429				
Há diferença significativa entre os estratos?	NÃO				

Figura 15- Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos animais estudados em função de tumores únicos ou múltiplos.

Não houve diferença estatisticamente significativa na sobrevida em relação à morfologia tumoral. O carcinoma cribriforme apresentou valor de sobrevida mediana inferior quando comparado aos carcinomas tubulopapilar e mucinoso, indicando um pior prognóstico (Tabela 14; Figura 16).

Tabela 14- Correlação entre os tipos morfológicos, relacionada a sobrevida, para os animais acometidos pelo carcinoma mamário felino, pelo teste estatístico de Log-rank. São Paulo, 2017

MORFOLOGIA	Valor de p	Tumores	Mortes	Mortalidade	Mediana
Carcinoma cribriforme	1	7	6	85,71%	365
Carcinoma em tumor benigno	0,54	3	3	100,00%	365
Carcinoma tubulopapilar	0,96	17	13	76,47%	395
Carcinoma sólido	0,14	11	6	54,55%	NA
Carcinoma mucinoso	0,17	1	1	100,00%	880
Log-rank	0,066				
Há diferença significativa entre os estratos?	NÃO				

Figura 16- Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos animais estudados em função dos tipos histológicos.

De forma semelhante ao tipo histológico, não foi obtida diferença estatisticamente significativa entre os diferentes graus histológicos correlacionados a sobrevida. Comparado aos graus I e II, o grau III tende a apresentar um pior prognóstico, com uma sobrevida mediana de 150 dias (Tabela 15; Figura 17).

Tabela 15- Correlação entre os diferentes graus histológicos, relacionada à sobrevida, para os animais acometidos pelo carcinoma mamário felino, pelo teste estatístico de Log-rank. São Paulo, 2017

GRAU	Valor de p	Animais	Mortes	Mortalidade	Mediana
I	1	10	10	100,00%	545
II	0,93	22	14	63,64%	NA
III	0,05	7	5	71,43%	150
Log-rank	0,0643				
Há diferença significativa entre os estratos?	NÃO				

Figura 17- Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos animais estudados em função da graduação histológica.

O marcador de proliferação celular Ki67 foi avaliado isoladamente em relação a sobrevida. Foi realizada comparação baseada no ponto de corte proposto por Soares et al. (SOARES et al., 2016d), e não houve diferença significativa em relação à sobrevida (Tabela 16; Figura 18).

Tabela 16- Correlação entre valores acima e abaixo de 14% para Ki67, relacionada à sobrevida, para os animais acometidos pelo carcinoma mamário felino, pelo teste estatístico de Log-rank. São Paulo, 2017

KI67	Valor de p	Tumores	Mortes	Mortalidade	Mediana
[0-14)	1	2	2	100,00%	395
[14-100)	0,96	36	27	75,00%	880
Log-rank	0,955				
Há diferença significativa entre os estratos?	NÃO				

Figura 18- Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos animais estudados em função do Ki67 (*cutoff* de 14%)

Foram correlacionados os subtipos moleculares encontrados nestes estudo, os quais foram classificados de acordo com os critérios estabelecidos por (SOARES et al., 2016b). O subtipo Luminal A não foi incluído pelo fato de representar a gata que veio a óbito por causas não relacionadas à doença. De acordo com a curva de Kaplan Meier, sugere-se um pior prognóstico para o subtipo triplo negativo “normal-like” e um melhor prognóstico para o subtipo Luminal B HER-2 negativo, embora não tenha sido observada diferença significativa entre estas variáveis (Tabela 17; Figura 19).

Tabela 17- Correlação entre diferentes subtipos moleculares, de acordo com (SOARES et al., 2016b), relacionada à sobrevida, para os animais acometidos pelo carcinoma mamário felino, pelo teste estatístico de Log-rank. São Paulo, 2017

SUBTIPO MOLECULAR	Valor de p	Tumores	Mortes	Mortalidade	Mediana
Triplo negativo 'normal like'	1	13	10	76,92%	NA
Triplo negativo basal like'	0,111	13	12	92,31%	880
Luminal B HER-2 negativo	0,997	2	0	0,00%	NA
HER-2 positivo	0,086	10	7	70,00%	NA
Log-rank	0,172				
Há diferença significativa entre os estratos?	NÃO				

Figura 19- Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos animais estudados em função dos tipos moleculares

6. DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar os aspectos clínico-epidemiológicos, patológicos e moleculares dos carcinomas mamários em felinos, determinando a correlação de cada um destes parâmetros com a sobrevida global e, conseqüentemente, avaliando o seu valor prognóstico. Para isso, foram incluídas 42 gatas neste estudo, as quais apresentaram idade média de $12,3 \pm 2,9$ anos, valor muito próximo do intervalo de 10 a 12 anos relatado na literatura (WEIJER; HART, 1983b; MISDORP, W.; ROMIJN; HART, 1991; HUGHES; DOBSON, 2012; ZAPPULLI et al., 2015). Adicionalmente, os dados de sobrevida indicaram um pior prognóstico em animais com idade superior a 12 anos, os quais representaram 50% desta casuística. Não foram encontrados dados comparativos entre idade e sobrevida na literatura consultada, porém diversos autores relataram um maior risco de ocorrência da doença a partir dos 14 anos (WEIJER; HART, 1983a; MISDORP, W.; ROMIJN; HART, 1991; HUGHES; DOBSON, 2012; ZAPPULLI et al., 2015).

Alguns estudos relatam uma maior predisposição para o desenvolvimento das neoplasias mamárias em gatas da raça siamesa (HAYES; MILNE; MANDELL, 1981; SEIXAS et al., 2007). Apesar disso, a maior parte dos animais (71,4%) neste trabalho não apresentaram raça definida, corroborando com os resultados de outro estudo brasileiro (CUNHA et al., 2016). Weijer e Hart (1983a; b) relataram um pior prognóstico em felinos das raças de pelo longo em análise univariada, no entanto, esta significância foi perdida após análise multivariada. No presente estudo, o padrão racial não se mostrou como um valor prognóstico relevante, possivelmente devido ao fato de haver maior prevalência de felinos SRD no Brasil, dificultando a avaliação prognóstica da predisposição racial. Da mesma forma, Soares e colaboradores (2016b; c) não observaram correlação entre a sobrevida de diferentes raças após análise multivariada.

Sabe-se que o carcinoma mamário em gatas tende a apresentar um comportamento agressivo, com alta capacidade metastática para linfonodos regionais e órgãos distantes (WEIJER; HART, 1983b; MACEWEN; WITHROW, 1989; MOULTON, 1990). Observou-se que 38,1% das gatas neste estudo apresentaram metástase em linfonodo regional, porém esta informação não foi obtida em 35,7% dos animais. Semelhantemente, os dados relacionados a presença de metástase a distância estavam ausentes em muitos dos animais, principalmente pela falta de exames de imagem ou necropsia completa dos animais que vieram à óbito. Este

viés metodológico impediu que os animais fossem classificados quanto ao estadiamento clínico preconizado por (MORRIS, 2013).

A ausência de informações também se repetiu em outras variáveis, como no *status* reprodutivo ou em relação ao uso de progestágenos, fazendo com que alguns animais fossem excluídos da avaliação prognóstica e, conseqüentemente, reduzindo o número amostral e comprometendo a análise estatística. Independentemente deste viés, não foi observada diferença significativa na sobrevida quando comparados os animais inteiros aos castrados, como já foi relatado em outros estudos (WEIJER; HART, 1983a; ITO et al., 1996; OVERLEY et al., 2005). Ainda, o uso de progestágenos também não apresentou correlação com a sobrevida, embora alguns autores tenham demonstrado um maior risco de desenvolvimento de tumores mamários em animais submetidos à terapia anticonceptiva (HAYDEN; BARNES; JOHNSON, 1989; MISDORP, W., 1991; SKORUPSKI et al., 2005).

O tempo médio de sobrevida após a detecção do tumor mamário em gatas que não foram submetidas a nenhum tipo de tratamento gira em torno de 12 meses. No entanto, este período pode variar consideravelmente entre os estudos, levando em consideração o estadiamento clínico dos animais e o intervalo entre o diagnóstico e a excisão tumoral (HAHN; BRAVO; AVENELL, 1994; GIMÉNEZ et al., 2010). A cirurgia é considerada o método primário de tratamento das neoplasias mamárias em felinos (MORRIS, 2013; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013; ZAPPULLI et al., 2015), o que se comprovou no presente trabalho, no qual todos os animais foram submetidos à mastectomia. No que se refere à extensão do procedimento cirúrgico adotado, mastectomia unilateral ou bilateral, este fator não foi avaliado quanto ao seu valor prognóstico devido à ausência desta informação em muitos casos. No estudo de Cunha *et al* (2016), o tempo médio de sobrevida de felinos submetidos apenas ao procedimento cirúrgico foi de 25,6 meses. No presente estudo, a maioria (77,78%) dos animais que vieram a óbito por causas relacionadas à doença apresentaram sobrevida inferior a 12 meses. Este dado pode sugerir uma maior agressividade destes tumores, assim como um estadiamento clínico dos animais mais avançado ou, ainda, um maior intervalo temporal entre a detecção do tumor e a realização da mastectomia. Devido à ausência desta informações, não é possível determinar qual ou quais foram os fatores que influenciaram negativamente na sobrevida destes animais.

Em relação ao uso de protocolos quimioterápicos pós-cirúrgicos, esta variável não apresentou valor prognóstico, corroborando os dados relatado por McNeill e colaboradores (2009). Porém, este resultado é contrário a outros estudos que observaram benefícios no tempo de sobrevida quando a quimioterapia foi associada à cirurgia (NOVOSAD, 2003;

MCNEILL et al., 2009; DE CAMPOS et al., 2014). Este resultado contraditório pode ser explicado pelo pequeno número amostral de animais que receberam a quimioterapia, além dos protocolos utilizados serem variados entre os animais ou mesmo descontinuados para alguns deles.

As características macroscópicas dos tumores mamários em gatas, como tamanho e presença de ulceração, têm sido relatadas como fatores correlacionados a sobrevida em diversos estudos (WEIJER et al., 1972; ITO et al., 1996; SEIXAS et al., 2011; MILLS et al., 2015; SOARES et al., 2016b), ressaltando sua importância na construção do prognóstico para o carcinoma mamário em felinos (Weijer *et al.*, 1972; Ito *et al.*, 1996; Seixas *et al.*, 2011; Mills *et al.*, 2015; Soares, Correia, *et al.*, 2016. No presente estudo, a avaliação do tamanho tumoral foi realizada segundo os critérios de Morris (2013), evidenciando uma maior taxa de mortalidade para animais que apresentaram tumores maiores que 3 cm (T3). Porém, não houve diferença significativa do tamanho tumoral em relação à sobrevida dos animais.

Apesar de sua importância, os dados da literatura em relação ao valor prognóstico do tamanho tumoral ainda são contraditórios. Em análise multivariada realizada em 64 gatas, (SEIXAS et al., 2011) também não demonstraram correlação entre estas duas variáveis. Por outro lado, Mills *et al* (2015) e Ito *et al* (1996) descreveram um menor tempo de sobrevida em animais com tumores maiores de 3 cm. Adicionalmente, outros autores encontraram associação dos diferentes tamanhos tumorais (T1, T2 e T3) ao prognóstico, considerando o tamanho tumoral como uma variável de valor independente em análise multivariada de 42 gatas (SOARES et al., 2016b). Apesar dos resultados contraditórios, o tamanho do tumor ainda não pode ser descartado como influenciador da sobrevida para os carcinomas mamários em felinos, especialmente porque outros fatores podem influenciar esta medida, como tempo de evolução até o diagnóstico e graduação histológica.

Em contrapartida, a presença de ulceração mostrou relevância como valor prognóstico, uma vez que os animais com tumores ulcerados apresentaram um menor tempo de sobrevida em relação aos animais com tumores não ulcerados. Estes resultados foram semelhantes aos demonstrados por Soares *et al* (2016b), que relataram uma correlação negativa entre sobrevida e período livre de doença com a presença de ulceração, descrevendo-a como um fator isolado de importância prognóstica para o carcinoma mamário felino. Ainda, foram avaliadas a influência do volume do tumor e da ocorrência de tumores únicos ou múltiplos na sobrevida dos animais. Estas duas características não são habitualmente associadas ao valor prognóstico do câncer mamário em gatas, mas foram incluídas neste estudo com a intenção de

testá-las como novas variáveis macroscópicas. No entanto, após análise estatística, ambas as características não apresentaram valor prognóstico.

Em relação aos aspectos microscópicos, alguns estudos avaliaram os subtipos e a graduação histológica dos carcinomas mamários como valor prognóstico em felinos. Apesar de apresentarem resultados contraditórios e/ou critérios de graduação distintos, os resultados evidenciam a importância destes parâmetros na sobrevida dos animais (ELSTON, C.W.; ELLIS, 1998; MILLANTA et al., 2002a; ELLIS et al., 2003; SEIXAS et al., 2011; MILLS et al., 2015; DE CAMPOS et al., 2016; SOARES et al., 2016b; SOARES et al., 2016a). Diversos estudos demonstraram que os subtipos histológicos não tiveram valor prognóstico (CASTAGNARO et al., 1998; MISDORP, W et al., 1999; MILLANTA et al., 2002a; SOARES et al., 2016b). Porém, Mills e colaboradores (2015) relataram uma menor sobrevida em gatas com carcinomas sólidos ou cribriformes, com medianas de 10 e 8 meses, respectivamente; e maior sobrevida naquelas com carcinomas tubulopapilares, com mediada de 21 meses. Adicionalmente, Novosad e colaboradores (2006) observaram menor sobrevida total em animais com carcinomas anaplásicos e maior em animais com carcinomas papilares e tubulares. No presente estudo, não foi encontrada diferença significativa entre os subtipos histológicos relacionados a sobrevida, mas houve uma tendência ($p = 0,066$) dos animais com carcinomas cribriformes apresentarem uma menor sobrevida em relação aos carcinomas mucinoso ou tubulopapilares. Assim, infere-se que um maior número amostral revelaria um valor estatisticamente significativo.

O sistema de graduação histológica estabelecido por Elston (1991), conhecido como Sistema de Nottingham, tem sido amplamente utilizado para tumores mamários felinos, demonstrando forte correlação com o prognóstico em alguns estudos (ELSTON, C.W.; ELLIS, 1998; ELLIS et al., 2003). Segundo Seixas *et al* (2011), este método de classificação pode ser considerado um fator de prognóstico superior ao tipo histológico, altamente confiável e independente, identificando grupos de gatas com alto risco para o desenvolvimento de metástases. Alguns autores relataram menores tempo de sobrevida e período livre de doença em gatas com tumores grau III (MILLANTA et al., 2002b).

Apesar da importância desta graduação histológica como valor prognóstico, o presente estudo não obteve diferença significativa entre os diferentes graus correlacionados à sobrevida dos animais. No entanto, foi observada uma tendência ($p = 0,063$) de um pior prognóstico nos animais com tumores grau III em relação aos tumores grau I. Deve-se ressaltar que a metodologia de graduação utilizada poderia ser a responsável pela ausência de significância nos resultados obtidos neste estudo. Alguns autores tem questionado a eficiência

do Sistema de Nottingham (ELSTON, C. W.; O., 1991; CASTAGNARO et al., 1998) na graduação de tumores mamários em felinos. Neste contexto, (MILLS et al., 2015) propuseram um novo modelo de graduação, no qual observaram correlação significativa entre os três graus tumorais com a sobrevida dos animais. E, interessante, esta diferença não havia sido evidenciada quando foi aplicado o Sistema de Nottingham. Recentemente, (SOARES et al., 2016b) utilizaram os dois métodos de graduação e detectaram associação com a sobrevida apenas com o sistema proposto por (MILLS et al., 2015), em análise univariada. Desta forma, o fato do Sistema de Nottingham ter sido selecionado para a graduação histológica neste estudo pode justificar a ausência de correlação significativa entre o grau tumoral e a sobrevida.

Atualmente, diversos tratamentos inovadores e mais eficazes vem sendo propostos após avanços expressivos na subclassificação molecular de tumores a partir de sistemas baseados em marcadores imunofenotípicos (SOARES et al., 2016a). Neste contexto, o índice de proliferação celular calculado pela imunomarcagem do Ki67 demonstrou ser um biomarcador prognóstico em carcinomas mamários felinos. Carcinomas com índices superiores à 14% apresentam correlação significativa com a sobrevida global, maior tamanho tumoral, baixa diferenciação celular, presença de necrose e *status* negativo para HER-2 e RE (SOARES et al., 2016b; SOARES et al., 2016d). No presente trabalho, apesar do mesmo ponto de corte ter sido adotado, não foi observada correlação do índice de proliferação com a sobrevida dos animais. Um fator que pode ter influenciado neste resultado foi a seleção do ponto de corte em 14%, que foi analisado em uma outra casuística e talvez não seja representativa para estes animais, ainda mais considerando que a maior parte dos tumores apresentaram índices de proliferação superiores a 14%.

Recentemente, a classificação molecular proposta no encontro de especialistas “St. Gallen International Expert Consensus Panel” para o tumor de mama em mulheres foi utilizada na avaliação clínico-patológica de 229 tumores de mama em 102 gatas (SOARES et al., 2016a). Neste mesmo estudo, o subtipo mais prevalente foi o luminal B/HER2-negativo (29,4%), seguido pelo luminal B/HER2-positivo (19,6%), triplo negativo basal-like (16,7%), luminal A (14,7%), triplo negativo normal-like (12,7%) e HER2-positivo (6,9%). (DE CAMPOS et al., 2016) demonstraram marcação positiva para RP e RE na maioria dos tumores, porém utilizaram critérios de classificação gerais com algumas diferenças do estudo anterior. Em contrapartida, (WIESE et al., 2013) relataram que 58,3% dos carcinomas mamários de seu estudo eram triplo negativos, e que destes, 78,6% apresentaram o subtipo “basal-like”. Em concordância com este último autor, a caracterização dos subtipos

moleculares dos carcinomas mamários no presente estudo demonstrou que 64,5% dos tumores eram triplo negativos, sendo que destes, 45% eram representados pelo subtipo “basal-like”.

Em relação à sobrevida associada aos subtipos moleculares, (SOARES et al., 2016b) demonstraram que os subtipos tumorais HER-2 positivo ou triplo negativo “basal-like” apresentaram maior chance de morte em relação aos demais subtipos moleculares. No presente estudo, não foram encontradas diferenças significativas entre os subtipos moleculares e a sobrevida dos animais. Entretanto, pela curva de *Kaplan-Meier*, pode-se sugerir um pior prognóstico para o subtipo triplo negativo “normal-like”, e um melhor prognóstico para o subtipo Luminal B HER-2 negativo. O subtipo Luminal A não entrou na avaliação estatística devido às exclusões dos animais com morte não relacionada à doença. O fato dos subtipos moleculares não apresentarem valor prognóstico nos carcinomas mamários analisados desta casuística deve-se, possivelmente, ao menor número amostral quando comparado ao estudo de (SOARES et al., 2016b). Ainda, apenas um tumor foi classificado como Luminal A, o qual ainda teve que ser excluído pois o óbito do animal ocorreu por causas não relacionadas ao tumor.

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente estudo reforçou o caráter agressivo do carcinoma mamário em felinos e permitiu a caracterização molecular dos subtipos tumorais em uma população de gatos no Brasil. Ainda, este estudo demonstrou um pior prognóstico em animais com mais de 12 anos de idade e com tumores ulcerados. As variáveis raça, *status* reprodutivo, uso de anticoncepcionais, tratamento instituído, multiplicidade dos tumores, tamanho tumoral, volume tumoral, tipo e graus histológicos, índice de proliferação celular (Ki67>14%) e subtipos moleculares não apresentaram valor prognóstico nesta casuística. A ausência de informações clínicas, assim como o caráter de análise multivariada dos outros estudos e o reduzido número amostral podem ter contribuído para estes resultados sem significância estatística. Os resultados demonstrados aqui ressaltam a importância da correlação clínica, patológica e molecular na determinação dos fatores prognósticos e, consequentemente, no desenvolvimento de novos procedimentos e alvos terapêuticos.

REFERÊNCIAS

ABRAMSON, V. G.; LEHMANN, B. D.; BALLINGER, T. J.; PIETENPOL, J. A. Subtyping of triple-negative breast cancer: implications for therapy. **Cancer**, v. 121, n. 1, p. 8-16, 2015.

BORREGO, J. F.; CARTAGENA, J. C.; ENGEL, J. Treatment of feline mammary tumours using chemotherapy, surgery and a COX-2 inhibitor drug (meloxicam): a retrospective study of 23 cases (2002-2007)*. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 7, n. 4, p. 213-221, 2009.

BRUNETTI, B.; ASPRONI, P.; BEHA, G.; MUSCATELLO, L. V.; MILLANTA, F.; POLI, A.; BENAZZI, C.; SARLI, G. Molecular phenotype in mammary tumours of queens: correlation between primary tumour and lymph node metastasis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 148, n. 2-3, p. 206-213, 2013.

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

CASTAGNARO, M.; DE MARIA, R.; BOZZETTA, E.; RU, G.; CASALONE, C.; BIOLATTI, B.; CARAMELLI, M. Ki-67 index as indicator of the post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. **Research in Veterinary Science**, v. 65, n. 3, p. 223-226, 1998.

CUNHA, S.; CORGOZINHO, K.; JUSTEN, H.; SILVA, K.; LEITE, J.; & FERREIRA, A. M. Survival and disease-free interval of cats with mammary carcinoma treated with chain mastectomy. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, n., p. 1-8, 2016.

DE ABREU, E.; KOIFMAN, S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 1, p. 113-131, 2002.

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

DE CAMPOS, C. B.; DAMASCENO, K. A.; GAMBA, C. O.; RIBEIRO, A. M.; MACHADO, C. J.; LAVALLE, G. E.; CASSALI, G. D. Evaluation of prognostic factors and survival rates in malignant feline mammary gland neoplasms. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 18, n. 12, p. 1003-1012, 2016.

DE LAS MULAS, J. M.; REYMUNDO, C. Animal models of human breast carcinoma: canine and feline neoplasms. **Revista de Oncología**, v. 2, n., p. 274-281, 2000.

DE MARIA, R.; OLIVERO, M.; IUSSICH, S.; NAKAICHI, M.; MURATA, T.; BIOLATTI, B.; DI RENZO, M. F. Spontaneous feline mammary carcinoma is a model of HER2 overexpressing poor prognosis human breast cancer. **Cancer Research**, v. 65, n. 3, p. 907-912, 2005.

DIAZ, L. K.; CRYNS, V. L.; SYMMANS, W. F.; SNEIGE, N. Triple negative breast carcinoma and the basal phenotype: from expression profiling to clinical practice. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 14, n. 6, p. 419-430, 2007.

EDWARDS, B. K.; NOONE, A. M.; MARIOTTO, A. B.; SIMARD, E. P.; BOSCOE, F. P.; HENLEY, S. J.; JEMAL, A.; CHO, H.; ANDERSON, R. N.; KOHLER, B. A.; EHEMAN, C. R.; WARD, E. M. Annual Report to the Nation on the status of cancer, 1975-2010, featuring prevalence of comorbidity and impact on survival among persons with lung, colorectal, breast, or prostate cancer. **Cancer**, v. 120, n. 9, p. 1290-1314, 2014.

ELLIS, I. O.; SCHNITT, S. J.; SASTRE-GARAU, X.; BUSSOLATI, G.; TAVASSOLI, F. A.; EUSEBI, V.; PETERSE, J. L.; MUKAI, K.; TABÁR, L.; JACQUEMIER, J.; CORNELISSE, C. J.; SASCO, A. J.; KAAKS, R.; PISANI, P.; GOLGAR, D. E.; DEVILLE, P.; CLETON-JANSEN, M. J.; BØRRESEN-DALE, M. J.; T, V.; VEER, L.; SAPINO, A. Invasive breast carcinoma. In: (Ed.). **Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. World Health Organization Classification of Tumours**. Lyon, France: IARC, Press, 2003, p.13-59.

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

ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Assessment of histological grade. In: (Ed.). **Systemic Pathology – The Breast**. London: Churchill and Livingstone, 1998. v.13, p.365–384.

GIMÉNEZ, F.; HECHT, S.; CRAIG, L. E.; LEGENDRE, A. M. Early detection, aggressive therapy: optimizing the management of feline mammary masses. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, n. 3, p. 214-224, 2010.

GOLDHIRSCH, A.; WINER, E. P.; COATES, A. S.; GELBER, R. D.; PICCART-GEHBART, M.; THÜRLIMANN, B.; SENN, H. J.; MEMBERS, P. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. **Annals of Oncology**, v. 24, n. 9, p. 2206-2223, 2013.

HAHN, K. A.; BRAVO, L.; AVENELL, J. S. Feline breast carcinoma as a pathologic and therapeutic model for human breast cancer. **In Vivo**, v. 8, n. 5, p. 825-828, 1994.

HAYDEN, D. W.; BARNES, D. M.; JOHNSON, K. H. Morphologic changes in the mammary gland of megestrol acetate-treated and untreated cats: a retrospective study. **Veterinary Pathology**, v. 26, n. 2, p. 104-113, 1989.

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

HEROLD, C. I.; ANDERS, C. K. New targets for triple-negative breast cancer. **Oncology (Williston Park)**, v. 27, n. 9, p. 846-854, 2013.

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

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

KITCHELL, B.; LARUE, S. M.; ROOKS, R.; ONCOLOGY, A. C. A. R. C. D. O.; PRESS, A. **Veterinary Cancer Therapy Handbook: Chemotherapy, Radiation Therapy, and Surgical Oncology for the Practicing Veterinarian**: AAHA Press, 2000

LANA, S. E.; RUTTEMAN, G. R.; WITHROW, S. J. Tumors of the mammary gland. In: (Ed.). **small animal clinical oncology**. Philadelphia: Saunders, 2007, p.619-636.

LUPORSI, E.; ANDRÉ, F.; SPYRATOS, F.; MARTIN, P. M.; JACQUEMIER, J.; PENAULT-LLORCA, F.; TUBIANA-MATHIEU, N.; SIGAL-ZAFRANI, B.; ARNOULD, L.; GOMPEL, A.; EGELE, C.; POULET, B.; CLOUGH, K. B.; CROUET, H.; FOURQUET, A.; LEFRANC, J. P.; MATHELIN, C.; ROUYER, N.; SERIN, D.; SPIELMANN, M.; HAUGH, M.; CHENARD, M. P.; BRAIN, E.; DE CREMOUX, P.; BELLOCQ, J. P. Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 132, n. 3, p. 895-915, 2012.

MACEWEN, E. G.; HAYES, A. A.; HARVEY, H. J.; PATNAIK, A. K.; MOONEY, S.; PASSE, S. Prognostic factors for feline mammary tumors. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 185, n. 2, p. 201-204, 1984.

MACEWEN, E. G.; WITHROW, S. J. Tumors of the mammary gland. In: (Ed.). **Small Animal Clinical Oncology**. London: WB Saunders, 1989,

MATOS, A. J.; BAPTISTA, C. S.; GÄRTNER, M. F.; RUTTEMAN, G. R. Prognostic studies of canine and feline mammary tumours: the need for standardized procedures. **The Veterinary Journal**, v. 193, n. 1, p. 24-31, 2012.

MCNEILL, C. J.; SORENMO, K. U.; SHOFR, F. S.; GIBEON, L.; DURHAM, A. C.; BARBER, L. G.; BAEZ, J. L.; OVERLEY, B. Evaluation of adjuvant doxorubicin-based chemotherapy for the treatment of feline mammary carcinoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, n. 1, p. 123-129, 2009.

MILLANTA, F.; LAZZERI, G.; VANNOZZI, I.; VIACAVA, P.; POLI, A. Correlation of vascular endothelial growth factor expression to overall survival in feline invasive mammary carcinomas. **Veterinary Pathology**, v. 39, n. 6, p. 690-696, 2002a.

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. 39, n. 1, p. 120-126, 2002b.

MILLANTA, F.; CALANDRELLA, M.; BARI, G.; NICCOLINI, M.; VANNOZZI, I.; POLI, A. Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. **Research in Veterinary Science**, v. 79, n. 3, p. 225-232, 2005a.

MILLANTA, F.; CALANDRELLA, M.; CITI, S.; DELLA SANTA, D.; POLI, A. Overexpression of HER-2 in feline invasive mammary carcinomas: an immunohistochemical survey and evaluation of its prognostic potential. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 1, p. 30-34, 2005b.

MILLANTA, F.; CITI, S.; DELLA SANTA, D.; PORCIANI, M.; POLI, A. COX-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 98, n. 1, p. 115-120, 2006a.

MILLANTA, F.; CALANDRELLA, M.; VANNOZZI, I.; POLI, A. Steroid hormone receptors in normal, dysplastic and neoplastic feline mammary tissues and their prognostic significance. **Veterinary Record**, v. 158, n. 24, p. 821-824, 2006b.

MILLANTA, F.; ASPRONI, P.; CANALE, A.; CITI, S.; POLI, A. COX-2, mPGES-1 and EP2 receptor immunohistochemical expression in canine and feline malignant mammary tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 14, n. 3, p. 270-280, 2016a.

MILLS, S. W.; MUSIL, K. M.; DAVIES, J. L.; HENDRICK, S.; DUNCAN, C.; JACKSON, M. L.; KIDNEY, B.; PHILIBERT, H.; WOBESER, B. K.; SIMKO, E. Prognostic value of

histologic grading for feline mammary carcinoma: a retrospective survival analysis. **Veterinary Pathology**, v. 52, n. 2, p. 238-249, 2015.

MISDORP, W. Progestagens and mammary tumours in dogs and cats. **Acta Endocrinologica (Copenhagen)**, v. 125 Suppl 1, n., p. 27-31, 1991.

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

MISDORP, W.; ELSE, W.; HELLMEN, E.; LIPSCOMB, T. **Histological classification of the mammary tumors of the dog and the cat**: secondary title. Washington, 1999. 7, 1-59 p.

MORRIS, J. Mammary tumours in the cat: size matters, so early intervention saves lives. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 15, n. 5, p. 391-400, 2013a.

MOULTON, E. J. Tumors of the mammary gland. In: (Ed.). **Tumors in domestic animals**, 1990, p.518-552.

MUKHERJEE, S. **O imperador de todos os males: uma biografia do câncer**: Companhia Das Letras, 2012

MUSCATELLO, L. V.; SARLI, G.; BEHA, G.; ASPRONI, P.; MILLANTA, F.; POLI, A.; DE TOLLA, L. J.; BENAZZI, C.; BRUNETTI, B. Validation of tissue micro array for molecular profiling of canine and feline mammary tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 152, n. 2-3, p. 153-160, 2015.

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

NOVOSAD, C. A.; BERGMAN, P. J.; O'BRIEN, M. G.; MCKNIGHT, J. A.; CHARNEY, S. C.; SELTING, K. A.; GRAHAM, J. C.; CORREA, S. S.; ROSENBERG, M. P.; GIEGER, T. L. Retrospective evaluation of adjunctive doxorubicin for the treatment of feline mammary gland adenocarcinoma: 67 cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 42, n. 2, p. 110-120, 2006.

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

OWEN, L. N.; WHO. **TNM classification of tumors in domestic animals**, 1980

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. R300-307, 2004.

RAKHA, E. A.; ELSHEIKH, S. E.; ALESKANDARANY, M. A.; HABASHI, H. O.; GREEN, A. R.; POWE, D. G.; EL-SAYED, M. E.; BENHASOUNA, A.; BRUNET, J. S.; AKSLEN, L. A.; EVANS, A. J.; BLAMEY, R.; REIS-FILHO, J. S.; FOULKES, W. D.; ELLIS, I. O. Triple-negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal subtypes. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 7, p. 2302-2310, 2009.

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

SEIXAS, F.; PALMEIRA, C.; PIRES, M. A.; LOPES, C. 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.

SKORUPSKI, K. A.; OVERLEY, B.; SHOFR, F. S.; GOLDSCHMIDT, M. H.; MILLER, C. A.; SØRENMO, K. U. Clinical characteristics of mammary carcinoma in male cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 19, n. 1, p. 52-55, 2005.

SOARES, M.; CORREIA, J.; RODRIGUES, P.; SIMÕES, M.; DE MATOS, A.; FERREIRA, F. Feline HER2 protein expression levels and gene status in feline mammary carcinoma: optimization of immunohistochemistry (IHC) and in situ hybridization (ISH) techniques. **Microscopy and Microanalysis**, v. 19, n. 4, p. 876-882, 2013.

SOARES, M.; MADEIRA, S.; CORREIA, J.; PELETEIRO, M.; CARDOSO, F.; FERREIRA, F. Molecular based subtyping of feline mammary carcinomas and clinicopathological characterization. **Breast**, v. 27, n., p. 44-51, 2016a.

SOARES, M.; CORREIA, J.; PELETEIRO, M. C.; FERREIRA, F. St Gallen molecular subtypes in feline mammary carcinoma and paired metastases-disease progression and clinical implications from a 3-year follow-up study. **Tumor Biology**, v. 37, n. 3, p. 4053-4064, 2016.

SOARES, M.; RIBEIRO, R.; CARVALHO, S.; PELETEIRO, M.; CORREIA, J.; FERREIRA, F. Ki-67 as a Prognostic Factor in Feline Mammary Carcinoma: What Is the Optimal Cutoff Value? **Veterinary Pathology**, v. 53, n. 1, p. 37-43, 2016d.

SORENMO, K. U.; WORLEY, D. R.; GOLDSCHMIDT, M. H. Tumors of the Mammary Gland. In: (Ed.). **Small Animal Clinical Oncology (Fifth Edition)**, 2013, p.538–556.
TANG, Y.; HORIKOSHI, M.; LI, W. ggfortify: unified interface to visualize statistical results of popular R packages. **The R Journal**, v. 8, n. 2, p. 478-489, 2016.

THERNEAU, T. M.; GRAMBSCH, P. M. **Extending the Cox model**, 2000

VAN DE VIJVER, M. J.; HE, Y. D.; VAN'T VEER, L. J.; DAI, H.; HART, A. A.; VOSKUIL, D. W.; SCHREIBER, G. J.; PETERSE, J. L.; ROBERTS, C.; MARTON, M. J.; PARRISH, M.; ATSMAN, D.; WITTEVEEN, A.; GLAS, A.; DELAHAYE, L.; VAN DER VELDE, T.; BARTELINK, H.; RODENHUIS, S.; RUTGERS, E. T.; FRIEND, S. H.; BERNARDS, R. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 25, p. 1999-2009, 2002.

VASCELLARI, M.; BAIONI, E.; RU, G.; CARMINATO, A.; MUTINELLI, F. Animal tumour registry of two provinces in northern Italy: incidence of spontaneous tumours in dogs and cats. **BMC Veterinary Research**, v. 5, n., p. 39, 2009.

WEIJER, K.; HEAD, K. W.; MISDORP, W.; HAMPE, J. F. Feline malignant mammary tumors. I. Morphology and biology: some comparisons with human and canine mammary carcinomas. **The Journal of the National Cancer Institute**, v. 49, n. 6, p. 1697-1704, 1972.

WEIJER, K.; HART, A. A. Prognostic factors in feline mammary carcinoma. **The Journal of the National Cancer Institute**, v. 70, n. 4, p. 709-716, 1983a.

WEIJER, K.; HART, A. A. Prognostic factors in feline mammary carcinoma. **J Natl Cancer Inst**, v. 70, n. 4, p. 709-716, 1983b.

WICKHAM, H. ggplot2: elegant graphics for data analysis. **Journal of Statistical Software**, v. 31, n. 1, p. 65-88, 2010.

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

ZAPPULLI, V.; DE ZAN, G.; CARDAZZO, B.; BARGELLONI, L.; CASTAGNARO, M. Feline mammary tumours in comparative oncology. **Journal of Dairy Research**, v. 72 Spec No, n., p. 98-106, 2005.

ZAPPULLI, V.; RASOTTO, R.; CALIARI, D.; MAINENTI, M.; PEÑA, L.;
GOLDSCHMIDT, M. H.; KIUPEL, M. Prognostic evaluation of feline mammary carcinomas:
a review of the literature. **Veterinary Pathology**, v. 52, n. 1, p. 46-60, 2015.