ISIS PAIXÃO DE JESUS RIZKALLAH

**AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DA CONEXINA 43 NO
CARCINOMA MAMÁRIO EM FELINOS**

São Paulo

2019

ISIS PAIXÃO DE JESUS RIZKALLAH

**Avaliação imuno-histoquímica da conexina 43 no carcinoma
mamário 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
2019

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. 3847
FMVZ

Rizkallah, Isis Paixão de Jesus
Avaliação imuno-histoquímica da conexina 43 no carcinoma mamário em felinos / Isis
Paixão de Jesus Rizkallah. – 2019.
41 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2019.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Cogliati.

1. Gatas. 2. Comunicação intercelular. 3. Junções GAP. 4. Conexinas. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação imuno-histoquímica da conexina 43 no carcinoma mamário em felinos", protocolada sob o CEUA nº 3033310817 (ID 004593), sob a responsabilidade de **Bruno Cogliati e equipe; Isis Paixão de Jesus Rizkallah** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 28/02/2018.

We certify that the proposal "Immunohistochemical evaluation of connexin 43 in feline mammary carcinoma", utilizing 112 Cats (112 females), protocol number CEUA 3033310817 (ID 004593), under the responsibility of **Bruno Cogliati and team; Isis Paixão de Jesus Rizkallah** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 02/28/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **10/2017** a **10/2019**

Área: **Patologia Experimental E Comparada**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Gatos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **0 a 20 anos**

N: **50**

Linhagem: **Variadas**

Peso: **0 a 20 kg**

Origem: **Animais provenientes de doação espontânea**

Espécie: **Gatos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **0 a 20 anos**

N: **62**

Linhagem: **Variadas**

Peso: **0 a 20 kg**

Local do experimento: Não se aplica

São Paulo, 14 de agosto de 2019

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: RIZKALLAH, Isis Paixão de Jesus

Título: **Avaliação imuno-histoquímica da conexina 43 no carcinoma mamário 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 querida avó Maria do Carmo da Silva, mulher forte e determinada, nos seus braços confessei meus sonhos e com suas palavras incentivadoras tive o estímulo necessário para essa dura jornada.

À minha pequena Sophia, por me nutrir de amor e coragem, sua inocência me trouxeram a paz dentro desse turbilhão de sensações no decorrer da caminhada acadêmica.

A minha irmã Angela, por fazer meu mundo microscópico um fenômeno macroscópico colorido.

Aos meus pais por proporcionar as ferramentas para alcançar cada projeto pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

É um enorme desafio resumir a imensa e profunda gratidão que eu tenho a todos aqueles que, de uma forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho, e para a realização deste sonho, que é ser pesquisadora científica.

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus orixás, sem fé, amor e devoção, jamais chegaria até aqui: “A sua força me invade. O vento sopra e anuncia Oyá. Entrego a ti a minha fé. Não mexe comigo, eu sou a menina dos olhos de Oyá” (Ana Costa). Agradecer ao meu Ilê Ase Oba Aganju e meu Babalorisá Fábio ty Sango, minha Yagibonã Emanoela, a minha Yabassê Délia, que me mantiveram no caminho da fé e me conduziram pelas batalhas árduas dessa caminhada.

Sophia Rizkallah, minha filha, muito obrigada por sorrir cada vez que eu tinha medo, obrigada por me fazer forte a cada tropeço, obrigada por iluminar minha vida, obrigada por ser meu anjo protetor, me desculpe, pela ausência e noites longe de você. Obrigada por sempre me compreender.

Gostaria de agradecer a toda minha família, especialmente aos meus pais, Antonio e Maria, e minha preciosa vovó Maria do Carmo e minha irmã Angela pelo amor, carinho, apoio, compreensão sempre. Obrigada por sempre me incentivar a seguir meus sonhos e sempre me ajudar a conquistá-los.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Bruno Cogliati, muito obrigada, por ter aceitado o desafio e ter me auxiliado. Obrigada pelos ensinamentos, pelas oportunidades, pelo apoio e, principalmente, por acreditar na minha capacidade. Muito obrigado por nunca desistir de mim. Obrigada pela sua amizade.

A professora Maria Lucia Zaidan Dagli, por ser exemplo de mulher, mãe, esposa e pesquisadora, minha fonte de inspiração, obrigada por me aceitar em seu laboratório, sem a senhora esse caminho jamais começaria.

Gostaria de agradecer em especial minha mentora Tereza Cristina pelo incentivo durante toda essa jornada e pela eterna perseverança, mesmo diante das adversidades, acreditando no meu potencial. Devo muito a você Tet's.

Dr. Marcelo Sousa, Co-fundador da Start Up Bright-photomedicine – IPEN, amigo, chefe, sócio, obrigado por acreditar mais em mim do que eu mesma.

Ao meu querido David Salas, obrigado pelas madrugadas em claro, por todo cuidado, amor e dedicação.

Ao Jose Carlos Brunoro, meu muito obrigado, pela amizade de longa data, pela troca de conhecimento e sempre a oportunidade de aprender mais ao seu lado.

Aos funcionários do Núcleo de Patologia Quantitativa do Instituto Adolfo Lutz, Juliana M. Guerra, Leonardo Araújo, Lorenzo Lang e Camila Ferreira, muito obrigada por toda amizade, risadas, paciência, ensinamentos e apoio. Em especial a Juliana, que me abriu portas para um novo mundo dentro da pesquisa científica.

Fui muito grata também a colaboração de todos os colegas, funcionários, bolsistas do Centro de Patologia pela cordialidade e ensinamentos, em especial à Natália Fernandes, obrigada por me entender como mulher, mãe e me manter firme no meu propósito. Ao Rodrigo Réssio e à Cinthya Cirqueira que me apoiaram e me aconselharam com a técnica de imuno-histoquímica. Obrigada à Sônia Maria Pereira de Oliveira e à Diretoria Geral do Instituto Adolfo Lutz por acreditar no meu trabalho.

À equipe das Faculdades Metropolitanas Unidas (FMU): Dra Camila Utrera Zaroni, 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.

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.

A todos os professores do Departamento de Patologia da FMVZ-USP, muito obrigada pela contribuição na minha formação e aos queridos amigos, pós-graduandos, aprimorados, residentes e ex-residentes do Departamento de Patologia da FMVZ-USP, pelos momentos passados juntos.

Muito obrigada aos ex-funcionários (Buga e Marguitti), aos ex-alunos e aos alunos atuais do Laboratório de Patologia Morfológica e Molecular - LAPMOL da FMVZ-USP.

Aos amigos de pós-graduação Julieta, David, Cassia, Raquel, Veronica, Veronica M, Danilo, Vivian, Mariana Aranha, Marina, Andrea, Marcia, Pedro, Victor e

Josué, obrigada pelo companheirismo e apoio e às secretárias do Departamento de Patologia. Adriana e Milena, por todo o auxílio sempre prestado.

Agradecimento em especial a minha querida amiga Sofia Cicolo, amiga que a pós-graduação trouxe e laços se eternizaram a trás de um único amor pelos cavalos, obrigada pelas madrugadas de trabalho juntas.

Agradeço imensamente à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, onde o sonho começou, serei sempre grata e orgulhosa.

Ao programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Um agradecimento especial aos felinos, principalmente àqueles que fizeram parte desse projeto de pesquisa.

Gostaria de agradecer aos membros da Banca Examinadora que gentilmente aceitaram o convite de participar da avaliação desse projeto.

Os meus mais sinceros agradecimentos a todos aqueles que, de alguma maneira, contribuíram para que esse sonho se tornasse possível.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Processo nº 88887.360792/2019-00 Programa PROEX.

“Não deve haver limites para o esforço humano. Somos todos diferentes. Por pior do que a vida possa parecer, sempre há algo que podemos fazer em que podemos obter sucesso. Enquanto houver vida, haverá esperança”.

Stephen Hawking

RESUMO

RIZKALLAH, I. P. J. **Avaliação imuno-histoquímica da conexina 43 no carcinoma mamário em felinos**. [Immunohistochemical evaluation of connexin 43 in feline mammary carcinoma]. 2019. 41f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

As junções do tipo GAP, formadas por proteínas denominadas conexinas (Cx), são junções comunicantes responsáveis pelo fluxo intercelular de moléculas e íons, desempenhando importantes funções no controle da homeostasia tecidual. Ainda, participam no controle da proliferação celular, apoptose e de diversos mecanismos envolvidos na carcinogênese em diferentes tecidos. Nas neoplasias mamárias em humanos e cães, a Cx43 apresenta funções contraditórias, dependendo da fase do desenvolvimento tumoral. Considerando a importância da Cx43 nos processos de carcinogênese e os dados contraditórios sobre sua expressão em tumores mamários, este trabalho teve como principal objetivo avaliar a imunoexpressão da Cx43 nos carcinomas mamários em felinos, correlacionando-a com os dados clínico-patológicos e de sobrevida destes animais. Neste estudo, foram incluídas amostras tumorais de 23 gatas diagnosticadas com carcinomas mamários, as quais foram submetidas a análises histopatológicas e imuno-histoquímicas para detecção de marcadores moleculares e imunoexpressão da Cx43. Os parâmetros clínico-patológicos foram correlacionados com a sobrevida pelo teste de Log-rank ($P < 0,05$). A presença de metástase à distância e a realização de mastectomia unilateral correlacionaram-se a uma menor sobrevida nestes animais. A maioria dos carcinomas mamários (78,3%) apresentou baixa imunoexpressão da Cx43, porém sem correlação com a sobrevida. Os tumores com maior graduação histológica, assim com os subtipos histológicos e moleculares mais agressivos, apresentaram maior expressão da Cx43 quando comparados aos demais subtipos. Estes dados indicam uma correlação da Cx43 com o grau de malignidade tumoral, sugerindo sua participação na progressão dos carcinomas mamários em felinos.

Palavras-chave: Gatas. Tumores mamários. Comunicação intercelular. Junções GAP.

ABSTRACT

RIZKALLAH, I. P. J. Immunohistochemical evaluation of connexin 43 in feline mammary carcinoma. [**Avaliação imuno-histoquímica da conexina 43 no carcinoma mamário em felinos**]. 2019. 41f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

The GAP junctions, are formed by proteins called connexins (Cx), are communicating junctions responsible for the intercellular flow of molecules and ions, performing important functions in the control of tissue homeostasis. They also participate in the control of cell proliferation, apoptosis and various mechanisms involved in carcinogenesis in different tissues. In human and dog mammary neoplasms, Cx43 has contradictory functions, depending on the stage of tumor development. Considering the importance of Cx43 in carcinogenesis processes and contradictory data on its expression in mammary tumors, this study aimed to evaluate the immunoexpression of Cx43 in feline mammary carcinomas, correlating it with clinical and pathological survival data. animals. In this study, tumor samples from 23 cats diagnosed with mammary carcinomas were included and submitted to histopathological and immunohistochemical analyzes to detect molecular markers and immunoexpression of Cx43. Clinical-pathological parameters were correlated with survival by the Log-rank test ($P < 0.05$). The presence of distant metastasis and unilateral mastectomy were correlated with lower survival in these animals. Most breast carcinomas (78.3%) presented low immunoexpression of Cx43, but without correlation with survival. The tumors with higher histological grading, as well as the more aggressive histological and molecular subtypes, presented higher expression of Cx43 when compared to the other subtypes. These data indicate a correlation of Cx43 with the degree of tumor malignancy, suggesting its participation in the progression of feline mammary carcinomas.

Keywords: Cats. Mammary tumors. Intercellular communication. GAP junctions.

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1	CASUÍSTICA.....	16
3.2	PARÂMETROS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS	16
3.3	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	17
3.4	AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA	17
3.4.1	REAÇÃO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA	17
3.4.2	CLASSIFICAÇÃO DOS SUBTIPOS MOLECULARES	18
3.4.3	AVALIAÇÃO SEMI-QUANTITATIVA DA CONEXINA 43	19
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
4	RESULTADOS.....	21
4.1	CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS DAS PACIENTES.....	21
4.2	CARACTERÍSTICAS ANATOMOPATOLÓGICAS DAS NEOPLASIAS.....	21
4.3	AVALIAÇÃO DOS SUBTIPOS MOLECULARES E PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	22
4.4	AVALIAÇÃO SEMI-QUANTITATIVA DA CONEXINA 43	25
4.5	AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA	26
5	DISCUSSÃO	32
6	CONCLUSÕES	36
	REFERÊNCIAS.....	37

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama representa até 40% das neoplasias em felinos, sendo o terceiro tipo mais incidente nesta espécie, atrás apenas das neoplasias do tecido hematopoiético e cutâneo (MACEWEN et al., 1984; MILLANTA et al., 2002; OVERLEY et al., 2005; VASCELLARI et al., 2009; SORENMO et al. 2013). A maioria das gatas afetadas possuem entre 10 e 12 anos de idade e, apesar de não haver predisposição racial definida, existem relatos sobre uma maior incidência em gatas da raça Siamês (ZAPPULLI et al., 2015; CUNHA et al., 2016). Estudos não demonstraram diferenças no comportamento biológico de tumores em gatas castradas ou inteiras (WEIJER; HART, 1983; ITO et al., 1996). Porém, sabe-se que gatas castradas antes dos seis meses ou um ano de idade apresentam, respectivamente, 91% e 86% menos chances de desenvolver tumores mamários ao longo da vida (OVERLEY et al., 2005). Em contrapartida, gatas que realizaram tratamento com progestágenos injetáveis apresentam maior risco para o desenvolvimento de tumores mamários (HAYDEN; BARNES; JOHNSON, 1989; MISDORP, 1991; SKORUPSKI et al., 2005).

Nas gatas, ao contrário do que é observado em cães e humanos, cerca de 85 a 95% dos tumores mamários são malignos (MISDORP et al., 1999). Além disso, a doença tende a apresentar um comportamento mais agressivo, caracterizado por rápido crescimento, altas taxas de proliferação celular e grande capacidade metastática para linfonodos regionais e órgãos distantes (WEIJER; HART, 1983; MACEWEN; WITHROW, 1989; MOULTON, 1990; SORENMO et al., 2013). As taxas relatadas de metástases variam de 50% a 90% e afetam, mais frequentemente, os linfonodos regionais (83%), pulmões (83%), fígado (25%) e pleura (22%) (HAHN; BRAVO; AVENELL, 1994). O tempo médio de sobrevida após a detecção do tumor é de, aproximadamente, 12 meses, quando nenhum tipo de tratamento é realizado. No entanto, este intervalo pode variar consideravelmente de acordo com o estadiamento clínico e histopatológico, assim como pela associação à mastectomia (uni ou bilateral) e quimioterapia adjuvante (GIMÉNEZ et al., 2010; ZAPPULLI et al., 2015).

Diversos parâmetros clínico-epidemiológicos, anatomopatológicos e moleculares têm sido avaliados como fatores prognósticos nos carcinomas mamários em felinos, assim como marcadores preditivos para procedimentos terapêuticos. Estes incluem o estadiamento clínico, com base no tamanho do tumor, no

comprometimento dos linfonodos regionais e na presença de metástases distantes; graduação histológica; e, por fim, marcadores moleculares, tais como moléculas associadas ao ciclo celular (Ki-67), receptores de estrógeno (RE) e progesterona (RP), e o receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER-2) (WEIJER et al., 1972; CASTAGNARO et al., 1998; ORDÁS et al., 2004; ORDÁS et al., 2007; DE MARIA et al., 2005; MILLANTA et al., 2006; RASOTTO et al., 2011; SEIXAS et al., 2011; HUGHES; DOBSON, 2012; MANISCALCO et al., 2012; MATOS et al., 2012).

Nos últimos anos tem havido um crescente interesse no uso de marcadores imuno-histoquímicos em oncologia veterinária. Estes permitem adequações no manejo clínico, influenciando na conduta terapêutica e cirúrgica, além de informações importantes quanto ao prognóstico, com a utilização de marcadores próprios para este fim, comparando-os com os achados histológicos (HUGHES; DOBSON, 2012). Adicionalmente, a associação da positividade destes marcadores com a evolução dos pacientes permite uma compreensão da fisiopatogenia tumoral, além de aplicações na medicina translacional, buscando comparar as neoplasias felinas às humanas. Neste contexto, a busca por novos marcadores vem sendo expandida para diversos processos fisiológicos, como os mecanismos envolvidos na comunicação intercelular.

A sinalização intercelular direta é mediada, principalmente, por junções comunicantes ou junções do tipo *GAP*, que são canais compostos por 2 hemicanais (conexons) em células adjacentes, que por sua vez são formados por 6 proteínas, denominadas conexinas (Cx) (KRUTOVSKIKH; MIRONOV; YAMASAKI, 1996). As junções comunicantes controlam o fluxo intercelular de diversos reguladores da homeostase tecidual e, portanto, são consideradas determinantes críticas no controle do ciclo de vida celular (VINKEN et al., 2006; DAGLI; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, 2007). Sabe-se que as conexinas estão distribuídas em diversos tecidos de maneira abundante, com exceção do grupo de células musculares esqueléticas e células germinativas, podemos encontrar mais de um tipo de conexina nos diversos tecidos (LOSSO et al., 2008). No tecido mamário humano, dois tipos predominantes de conexinas são frequentemente expressos, sendo elas a Cx26, no epitélio luminal, e a Cx43, no mioepitélio basal (KANCZUDA-KOGA et al., 2007).

A Cx43 é considerada um supressor de tumores (NAUS; LAIRD, 2010), com estudos demonstrando a redução de sua expressão gênica e proteica em linhagens celulares tumorais (LEE et al., 1992; LAIRD et al., 1999), assim como sua localização

e fosforilação aberrantes em neoplasias (JAMIESON et al., 1998; KANCZUGA-KODA et al., 2003). Porém, dados da literatura indicam que a participação da Cx43 no câncer de mama ainda é controversa. Enquanto alguns estudos demonstram que a presença da Cx43 está correlacionada com uma menor sobrevida em pacientes com câncer de mama (LAIRD et al., 1999; STOLETOV et al., 2013), outros demonstram o contrário, ou seja, que a baixa ou nula expressão de Cx43 correlaciona-se com um pior prognóstico e menor sobrevida (TELEKI et al., 2014; CHASAMPALIONI et al., 2019).

A expressão da Cx43 apresenta associação com os mecanismos de proliferação, invasão e migração celular no câncer de mama em mulheres (EL-SAGHIR et al., 2011), assim como em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* (NICOLSON; DULSKI; TROSKO, 1988; REN et al., 1990; LI et al., 2008). Porém, alguns achados também indicam que a Cx43 está relacionada com os estágios avançados de progressão do câncer de mama, como observado pelo aumento da expressão de Cx43 em células metastáticas nos linfonodos (KANCZUGA-KODA et al., 2006). A imunoexpressão das Cx43 e Cx26 foi avaliada em glândulas mamárias normais, hiperplásicas e neoplásicas em cadelas, demonstrando correlação positiva com uma maior proliferação celular e agressividade tumoral (TORRES et al., 2005). Entretanto, outro estudo não identificou correlação da expressão gênica de Cx43 com malignidade em tumores mamários caninos (GOTOH et al., 2006). Ressalta-se que, até o momento, inexistem dados sobre a expressão e participação das conexinas no tecido mamário normal ou neoplásico em felinos.

Dessa forma, devido a importância da Cx43 nos processos de carcinogênese e considerando os dados contraditórios sobre sua expressão em tumores mamários em humanos e cães, este trabalho teve como principal objetivo avaliar a imunoexpressão da Cx43 nos carcinomas mamários em felinos, assim como correlaciona-la com os dados clínico-epidemiológicos, anatomopatológicos e de sobrevida destes animais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a imunexpressão da Cx43 nos carcinomas mamários em felinos e correlaciona-la com os dados clínico-epidemiológicos, anatomopatológicos e de sobrevida destes animais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a imunexpressão da Cx43 nos carcinomas mamários em felinos;
- Correlacionar a imunexpressão da Cx43 nos carcinomas mamários com os parâmetros clínico-epidemiológicos e anatomopatológicos destes animais;
- Correlacionar a imunexpressão da Cx43 nos carcinomas mamários com a sobrevida destes animais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi realizado no laboratório de Patologia Morfológica e Molecular (LAPMOL), que está inserido no Departamento de Patologia (VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP).

3.1 CASUÍSTICA

Em um estudo prospectivo realizado no período compreendido entre os anos de 2017 e 2018, foram coletadas amostras biológicas de 23 felinos que apresentavam tumores de mama. Estes animais foram provenientes dos Serviços de Cirurgia do Hospital Veterinário Público e dos Hospitais Escolas das Faculdades Metropolitanas Unidas (FMU) e Anhembi Morumbi. Anteriormente a coleta, os tutores foram orientados e tomaram ciência do presente estudo, onde foram especificados os objetivos do projeto e, posteriormente, o tutor leu e assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), previamente aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (protocolo CEUA nº. 3033310817).

3.2 PARÂMETROS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS

Os dados clínicos e epidemiológicos desta população foram obtidos juntamente aos prontuários médicos e/ou tutores de cada animal, incluindo os parâmetros de idade, raça, peso, multiplicidade de lesões, dimensões e volume das lesões, presença de ulceração e/ou aderência, presença de metástases em linfonodos regionais ou à distância, *status* reprodutivo, uso de anticoncepcionais e tratamentos quimioterápicos neoadjuvantes. As formações tumorais destes animais foram mensuradas com o auxílio de um paquímetro digital, para determinação do maior diâmetro. O seguimento clínico foi realizado para avaliação da sobrevida através de acompanhamento dos prontuários médicos e contato telefônico com os tutores responsáveis pelos animais. O tempo de sobrevida foi calculado em dias e considerou o período entre a data da cirurgia até o óbito relacionado ou não à doença.

O estadiamento clínico foi realizado de acordo com o sistema TNM, preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (OWEN; 1980), e posteriormente adaptado para felinos (MORRIS, 2013). Esse sistema consiste nos seguintes critérios: a) tamanho do tumor (T), correspondente ao maior diâmetro do nódulo mamário; b) comprometimento dos linfonodos regionais (N); e c) presença de metástase à distância (M). No que concerne ao tamanho tumoral (T), este parâmetro foi considerado como diâmetro máximo do tumor primário, sendo agrupado em T1, tumores com menos de 2 cm; T2, tumores compreendidos entre 2 e 3 cm e T3, tumores com mais de 3 cm de diâmetro. O comprometimento dos linfonodos foi avaliado por exames citológico e/ou histopatológico.

3.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Após o procedimento de mastectomia, diversos fragmentos da formação tumoral, margens cirúrgicas e os linfonodos regionais (inguinais e/ou axilares) foram coletados e fixados em formol tamponado a 10%, por no máximo 24 horas. Posteriormente, os tecidos foram processados histologicamente e incluídos em parafina. Cortes de 5 µm de cada amostra foram corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE). A avaliação histopatológica foi realizada de acordo com critérios propostos pela OMS (MISDORP, 1999). A graduação histológica foi realizada segundo os sistemas de Nottingham (ELSTON; ELLIS, 1991) e de MILLS et al. (2015). Os animais que apresentavam mais de uma formação neoplásica foram analisados e classificados separadamente. Em tumores que apresentavam mais de um padrão histopatológico no mesmo nódulo, foi considerado o subtipo mais predominante para conclusão do diagnóstico final.

3.4 AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

3.4.1 REAÇÃO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Para a realização do procedimento de imuno-histoquímica, foram realizados cortes histológicos de 5 µm de espessura nas amostras de pelo menos um tumor dos 29 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 TTBS, foi realizado o bloqueio de proteína com Protein Block (*Protein Block*, Cod. SPD-125, Spring Bioscience, Plaesanton, EUA), durante 15 minutos e estufa entre 20 e 25°C. As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários específicos (Tabela 1), diluídos em diluente de anticorpo *in house*, durante 16 horas (*overnight*), em câmara úmida e a 4°C. Após incubação, as lâminas foram lavadas com tampão de lavagem TTBS, 3 vezes por 5 minutos, e iniciado o sistema de visualização pelo kit *Polímero Reveal HRP* (Cod. SPD 125, Spring Bioscience, Plaesanton, EUA). Primeiramente foi aplicado o *Polímero Reveal HRP* por 10 minutos, seguido pelo reagente *HRP Conjugate HRP* por 15 minutos, ambos em temperatura ambiente (20-25°C). A seguir, as lâminas foram reveladas pelo cromógeno tetracloreto de 3-3' diaminobenzidina (DAB) por 5 minutos, em temperatura ambiente (20-25°C). 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 *Permout* (ThermoFischer). Todas as reações foram acompanhadas de tecidos de felinos para o controle positivo de cada anticorpo. O controle negativo foi obtido pela omissão do anticorpo primário da reação.

3.4.2 CLASSIFICAÇÃO DOS SUBTIPOS MOLECULARES

A classificação molecular dos carcinomas de mama em felinos foi realizada segundo os critérios propostos por SOARES et al. (2016), 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. 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).

Tabela 1- Condições para as reações de imunohistoquímica nos carcinomas mamários em felinos. São Paulo, 2019

Marcador	Marca	Clone	Diluição anticorpo	Tecido controle*
Receptor de estrógeno	Leica	6F11	1:500	Útero
Receptor de progesterona	Sta. Cruz	C-19	1:2000	Útero
HER-2	Dako	-	1:200	CA Mama
Ki-67	Dako	MIB-1	1:2000	Linfonodo
Citoqueratina 5/6	Leica	XM26	1:100	Pele
Conexina 43	Sigma	-	1:100	Coração

Fonte: Rizkallah, I. P. J. (2019).

HER-2: fator de crescimento epidérmico-2; Sta.: Santa; CA: carcinoma. *Tecidos de felinos.

3.4.3 AVALIAÇÃO SEMI-QUANTITATIVA DA CONEXINA 43

Para a avaliação semi-quantitativa da Cx43, as lâminas de imuno-histoquímica dos carcinomas mamários felinos foram analisadas de acordo com os critérios estabelecidos por Chasampalioti et al. (2019). As lâminas foram avaliadas por dois observadores independentes, em microscópio de luz, de acordo com percentual de células neoplásicas positivas, assim como sua intensidade de marcação. A intensidade da marcação membranosa e/ou citoplasmática das células neoplásicas foram avaliadas como negativa (0), fraca (1), moderada (2) ou intensa (3). O escore final foi calculado pela multiplicação da intensidade de imunomarcação da Cx43 pelo percentual de células marcadas (0 a 100%), obtendo um escore final de 0 a 300. Os carcinomas mamários foram classificados em baixa (escore ≤ 180) ou alta (escore > 180) imunexpressão de Cx43.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada no sistema SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*, Chicago, IL, EUA). Os resultados foram expressos em frequências absolutas e relativas e, para as variáveis quantitativas foi efetuada a estatística descritiva com o cálculo da média, desvio padrão, erro padrão, valores máximo e mínimo. A relação entre as variáveis categóricas foi realizada recorrendo ao teste de Fisher, uma vez que não foi possível utilizar o teste do *Qui-quadrado*, pois o número de observações esperadas foi inferior a 5 em mais de 20% das células. O nível de significância usado para todos os testes foi $\alpha=5\%$, ou seja, um valor de $p<0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS DAS PACIENTES

As gatas sem raça definida (SRD) foram as mais acometidas pelos tumores de mama (16/23; 69,6%); seguidas das raças Siamesa (4/23; 17,4%) e Persa (3/23; 13%). A idade média foi $12,39 \pm 2,60$ anos (faixa de 8 a 16 anos). Do total, 14 (60,9%) gatas eram castradas e 9 (39,1%) eram inteiras no momento da cirurgia. O uso de anticoncepcionais foi mencionado pelos tutores em 19 pacientes, sendo que 16/19 (84,2%) negaram o uso e 3/19 (15,8%) afirmaram terem aplicado os progestágenos exógenos em algum momento. Todas as gatas deste estudo foram submetidas à mastectomia, sendo que a técnica bilateral foi aplicada em 19/23 (82,6%) gatas e a unilateral apenas em 4/23 (17,4%) animais. Os dados sobre metástases foram obtidos em apenas 18 casos, sendo que as metástases regionais estavam presentes em 12/18 (66,7%) pacientes e as metástases distantes em 5/18 (33,3%) gatas. O tratamento quimioterápico foi realizado em 5/18 (27,8%) gatas. Os dados descritivos estão sumarizados e apresentados na tabela 2.

4.2 CARACTERÍSTICAS ANATOMOPATOLÓGICAS DAS NEOPLASIAS

Os tumores foram múltiplos em 14/23 (60,9%) dos casos, contra 9/23 (39,1%) de tumores únicos. O tamanho tumoral distribuiu-se como tumores T1 (8/22; 34,4%) T2 (5/22; 22,7%) e T3 (9/22; 40,9%). A presença de ulceração no tumor foi frequente, estando presente em 8/23 (34,8%) casos, enquanto a evidência de aderência foi observada em 3/16 (18,8%) dos casos. Dos 23 casos analisados, uma maior frequência do subtipo histológico cribiforme foi evidenciada em 12 (52,2%) tumores, seguido do sólido em 5 (21,7%) tumores e túbulopapilar em 5 (21,7%) tumores. Apenas um caso (4,3%) apresentou o subtipo de células escamosas. De acordo com a classificação histológica pelo sistema de Nottingham (ELSTON; ELLIS, 1991), o maior grau de malignidade (grau III) foi o mais frequente, sendo representado por 13/23 (56,5%) casos. Em seguida, o grau II apresentou 9/23 (39,1%) casos e, finalmente, o grau I foi presente em apenas um caso (4,3%). Na avaliação pela classificação de MILLS et al. (2015), o comportamento apresentou-se diferente, sendo o grau II o mais

frequente, com 11/23 (47,8%) casos, seguido pelo grau III em 7/23 (30,4%) casos e pelo grau I em 5/23 (21,7%) casos. O critério histológico de invasão dérmica foi observado em 9/19 (47,4%) casos e esteve ausente em 10/19 (52,6%) casos. É importante ressaltar que não foi possível avaliar esse critério em 4 casos, devido à escassez do tecido adjacente ao tumor. Os dados descritivos estão sumarizados e apresentados na tabela 2.

4.3 AVALIAÇÃO DOS SUBTIPOS MOLECULARES E PROLIFERAÇÃO CELULAR

Os subtipos moleculares foram determinados pela avaliação do painel imuno-histoquímico, previamente descrito por SOARES et al. (2016). Esta análise demonstrou que o subtipo molecular com maior frequência foi o triplo negativo “normal-like”, com 10/23 (43,5%) casos, seguido pelo luminal B HER-2 negativo com 6/23 (26,1%) casos. Por outro lado, os subtipos HER2 positivo, triplo negativo “basal-like” e luminal B HER-2 positivo foram observados com menor frequência, sendo representados em 4/23 (17,4%), 2/23 (8,7%) e 1/23 (4,3%) casos, respectivamente.

O marcador Ki-67, indicador de proliferação celular, foi detectado em uma média de $37,6 \pm 16,1\%$ das células neoplásicas (intervalo de 6 a 77%). Apesar de não ter diferença significativa ($P=0,478$), o comportamento do Ki-67 foi coerente com a classificação pelo sistema de Nottingham (ELSTON; ELLIS, 1991), na qual foi observada uma maior proliferação celular nos maiores graus de malignidade do tumor (graus II e III) (Figura 1A). Não foi observada uma diferença evidente entre a proliferação celular e os diferentes subtipos histológicos ($P=0,478$). Em relação aos subtipos moleculares, também não houve diferença significativa ($P=0,670$), porém observou-se uma maior proliferação nos carcinomas mamários do subtipo triplo negativo “basal-like” (Figura 1B). Os dados descritivos estão sumarizados na tabela 2 e representados na figura 1.

Tabela 2- Dados descritivos das características clínico-epidemiológicas e anatomopatológicas de gatas diagnosticadas com carcinomas mamários. São Paulo, 2019.

Características	N	% do Total
Raças (N=23)		
<i>SRD</i>	16	69,6
<i>Siamês</i>	4	17,4
<i>Persa</i>	3	13
Status reprodutivo (N=23)		
<i>Castrada</i>	14	60,9
<i>Inteira</i>	9	39,1
Uso de progestágenos (N=19)		
<i>Sim</i>	3	15,8
<i>Não</i>	16	84,2
Multiplicidade (N=23)		
<i>Único</i>	9	39,1
<i>Múltiplo</i>	14	60,9
Tamanho (N=22)		
<i>T1</i>	8	36,4
<i>T2</i>	5	22,7
<i>T3</i>	9	40,9
Ulceração (N=23)		
<i>Sim</i>	8	34,8
<i>Não</i>	15	65,2
Aderência (N=16)		
<i>Sim</i>	3	18,8
<i>Não</i>	13	81,3
Metástase em linfonodo (N=18)		
<i>Sim</i>	12	66,7
<i>Não</i>	6	33,3
Metástase à distância (N=19)		
<i>Sim</i>	5	26,3
<i>Não</i>	14	73,7
Estágio clínico (N=17)		
<i>I</i>	2	11,8
<i>II</i>	0	0
<i>III</i>	11	64,7
<i>IV</i>	4	23,5
Tipos Histológicos (N=23)		
<i>Sólido</i>	5	21,7
<i>Túbulo-papilar</i>	5	21,7
<i>Cribiforme</i>	12	52,2
<i>Células escamosas</i>	1	4,3
Invasão Dérmica (N=19)		
<i>Sim</i>	9	47,4
<i>Não</i>	10	52,6

Continuação

Características	N	% do Total
Graduação E&E (N=23)		
<i>Grau I</i>	1	4,3
<i>Grau II</i>	9	39,1
<i>Grau III</i>	13	56,5
Graduação Mills (N=23)		
<i>Grau I</i>	5	21,7
<i>Grau II</i>	11	47,8
<i>Grau III</i>	7	30,4
Subtipo Molecular (N=23)		
<i>Luminal B HER2 (-)</i>	6	26,1
<i>Luminal B HER2 (+)</i>	1	4,3
<i>HER2 (+)</i>	4	17,4
<i>TNBL</i>	2	8,7
<i>TNNL</i>	10	43,5
Mastectomia (N=23)		
<i>Bilateral</i>	19	82,6
<i>Unilateral</i>	4	17,4
Quimioterapia (N=18)		
<i>Sim</i>	5	27,8
<i>Não</i>	13	72,2

Fonte: Rizkallah, I. P. J. (2019).

SRD: sem raça definida; E&E: Elston & Elis; TNBL: triplo negativo “basal-like”; TNNL: triplo negativo “normal-like”; HER2: receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano.

Figura 1- Correlação da proliferação celular (Ki-67) com a graduação histológica pelo sistema de Nottingham (A) e subtipos moleculares (B) dos carcinomas mamários em felinos.

Fonte: Rizkallah, I. P. J. (2019).

HER2: receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano; LB: Luminal B; TN_BL: triplo negativo “basal-like”; TN_NL: triplo negativo “normal-like”.

4.4 AVALIAÇÃO SEMI-QUANTITATIVA DA CONEXINA 43

As células neoplásicas dos carcinomas mamários em felinos apresentaram imunomarcacão positiva para conexina 43, manifestando expressão citoplasmática de distribuição variável e em diferentes graus de intensidade (Figura 2). Após avaliação semi-quantitativa, de acordo com os critérios estabelecidos por Chasampalioti et al. (2019), os resultados evidenciaram que a maior parte dos carcinomas apresentou baixa imunoexpressão de Cx43 (18/23; 78,3%), sendo que apenas 3/23 (13,0%) casos tiveram uma alta imunoexpressão de Cx43 e dois (8,7%) casos foram negativos para esta proteína. Quando a imunoexpressão da Cx43 foi comparada com os subtipos histológicos (Figura 3A), o subtipo cribiforme exibiu um maior escore em comparação aos demais subtipos. Na comparação com a graduação histológica pelo sistema de Nottingham (ELSTON; ELLIS, 1991), observou-se uma maior expressão da Cx43 nos tumores classificados como grau II ($P=0,995$). Na correlação com os subtipos moleculares, a Cx43 apresentou um comportamento semelhante à expressão de Ki67 em relação aos subtipos triplo negativo “basal-like”, os quais apresentaram maior expressão (percentil 75: escore > 180) em relação aos demais subtipos ($P=0,163$). O único carcinoma do subtipo Luminal B HER2 positivo demonstrou uma expressão ainda maior (escore > 200). Por fim, os subtipos HER2 positivo, triplo negativo “normal-like” e Luminal B HER2 negativo apresentaram um escore de imunoexpressão baixo da Cx43.

Figura 2- Fotomicrografia ilustrativa da imunoexpressão da Cx43 em carcinomas mamários felinos

Fonte: Rizkallah, I. P. J. (2019).

- A) Marcação positiva para conexina 43 no carcinoma de mama em felino. Obj. 10x. B) Detalhe da imunoexpressão da conexina 43 nas células neoplásicas mamárias. Obj. 20x.

B)

Figura 3- Correlação da imunexpressão da Cx43 com os subtipos histológicos (A), graduação histológica pelo sistema de Nottingham (B) e subtipos moleculares (C) nos carcinomas de mama.

Fonte: Rizkallah, I. P. J. (2019).

HER2: receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano; LB: Luminal B; TN_BL: triplo negativo “basal-like”; TN_NL: triplo negativo “normal-like”.

4.5 AVALIAÇÃO DA SOBREVIDA

Do total de animais analisados, quatorze (60,8%) gatas vieram a óbito em diferentes períodos, sendo que apenas 6/23 (26,1%) gatas ainda se apresentaram vivas até o período final deste estudo. Por fim, em 3/23 (13,0%) casos não foi possível obter informações de sobrevida devido à perda de contato com os seus tutores. As pacientes desta casuística apresentaram um tempo de sobrevida médio de $343,6 \pm$

254,3 dias (variando de 1 a 1078 dias). Duas pacientes foram a óbito nas primeiras 72 horas após a mastectomia, possivelmente associadas a complicações pós-cirúrgicas. Após avaliação estatística, os parâmetros que apresentaram correlação significativa com uma menor sobrevida nos animais nesta casuística foram a presença de metástases a distância ($P=0,007$; Figura 4A) e a realização da mastectomia unilateral ($P=0,008$; Figura 4B).

Figura 4- Curvas de sobrevida (Kaplan Meier) das gatas com carcinomas mamários em função da presença de metástases à distância (A) e técnicas de mastectomia utilizadas (B).

Fonte: Rizkallah, I. P. J. (2019).

Os demais parâmetros clínico-epidemiológicos e anatomopatológicos não apresentaram correlação com a sobrevida dos animais nesta casuística, incluindo a realização da quimioterapia adjuvante ($P=0,061$; Figura 5A), uso prévio de progestágenos exógenos ($P=0,102$; Figura 5B), estadiamento clínico ($P=0,259$; Figura 5C), presença de ulceração tumoral ($P=0,135$; Figura 5D), presença de aderência ao tumor ($P=0,190$; Figura 5E), multiplicidade tumoral ($P=0,286$; Figura 5F), presença de invasão dérmica ($P=0,486$; Figura 6A), proliferação celular pelo Ki67 ($P=0,488$; Figura 6B), subtipos histológicos ($P=0,579$; Figura 6C), graduação histológica pelo sistema de Nottingham (ELSTON; ELLIS, 1991) ($P=0,656$; Figura 6D), graduação histológica pelo sistema de MILLS et al. (2015) ($P=0,328$; Figura 6E) e subtipos moleculares ($P=0,657$; Figura 6F). O comprometimento dos linfonodos também não apresentou associação com a sobrevida destes animais ($P=0,901$; dados não mostrados).

Figura 5- Curvas de sobrevida (Kaplan Meier) das gatas com carcinomas mamários em função de parâmetros clínico-epidemiológicos e anatomopatológicos.

Fonte: Rizkallah, I. P. J. (2019).

Figura 6- Curvas de sobrevida (Kaplan Meier) das gatas com carcinomas mamários em função de parâmetros clínico-epidemiológicos e anatomopatológicos.

Fonte: Rizkallah, I. P. J. (2019).

Por fim, como alvo central deste estudo, a imunexpressão da Cx43 também foi correlacionada com a sobrevida dos animais nesta casuística, porém não houve diferença significativa com esta variável ($P=0,453$; Figura 7).

Figura 7- Curvas de sobrevida (Kaplan Meier) das gatas com carcinomas mamários em função da imunexpressão da conexina 43.

Fonte: Rizkallah, I. P. J. (2019).

5 DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos na presente casuística, os animais sem raça definida (SRD) foram os mais acometidos pelo carcinoma mamário, ao contrário da prevalência apresentada em alguns estudos, onde a raça siamesa é a mais prevalente (WEIJER; HART, 1983; HAHN; BRAVO; AVENELL, 1994; SEIXAS et al., 2011; CUNHA et al., 2016). Este dado pode ser explicado pela maior prevalência de animais considerados SRD na população brasileira de felinos (CUNHA et al., 2016). A idade média encontrada neste estudo corrobora com a literatura, a qual relata uma idade média entre 10 e 12 anos (SILVA, 2010; DOBSON et al., 2012; ZAPPULLI et al., 2015). Esta casuística foi composta, predominantemente, por animais castrados, ao contrário do preconizado por outros autores (DORN et al., 1968; HAYES; MILNE; MANDELL, 1981; MISDORP; ROMIJN; HART, 1991). Porém, segundo OVERLEY et al. (2005), apenas animais castrados antes do primeiro ano de vida apresentam um menor risco no desenvolvimento de tumores mamários. Como no presente trabalho não foi possível determinar a idade exata de castração destes animais, não será possível correlacionar a participação deste importante fator de risco. Porém, sabe-se que a castração, quando realizada tardiamente, não representa um fator protetor para a carcinogênese mamária em felinos (OVERLEY et al., 2005).

Muitos autores descrevem o envolvimento dos linfonodos regionais como sendo um importante fator prognóstico no câncer de mama em diversas espécies (HELLMÉN et al., 1993; MISDORP 2002; QUEIROGA; LOPEZ, 2002). A avaliação dos linfonodos regionais não demonstrou resultado significativo em relação à sobrevida, porém as metástases à distância foram um fator determinante no pior prognóstico nesta casuística. Ou seja, os animais que apresentaram metástases distantes tiveram uma menor sobrevida, assim como relatado por OVERLEY et al. (2005). O estadiamento clínico pelo sistema TNM foi realizado a partir das informações sobre tamanho tumoral (T), comprometimento de linfonodos regionais (N) e metástases à distância (M) (MORRIS et al., 2013). Apesar de diversos estudos demonstrarem correlação do estadiamento clínico com a sobrevida, esta associação não foi identificada no atual trabalho (OWEN, 1980; BORREGO et al., 2009; MCNEILL et al., 2009).

As características macroscópicas dos tumores mamários em felinos, como tamanho tumoral e presença de ulceração, são fortemente relacionadas com a sobrevida, sendo consideradas importantes fatores prognósticos (ITO et al., 1996; SEIXAS et al., 2007; MILLS et al., 2015). O tamanho tumoral foi determinado segundo os critérios estabelecidos por Morris (2013), porém não houve associação desta variável com a sobrevida dos animais. Apesar da contradição com alguns estudos, este resultado está em concordância com SEIXAS et al. (2011), que não demonstraram correlação do tamanho do tumor com o prognóstico, baseado em uma análise multivariada em gatas com neoplasias mamárias. Também não foi identificada associação prognóstica com a ulceração tumoral nos animais do presente estudo. As glândulas mamárias inguinais (M5) e abdominais caudais (M4) são as mais acometidas pelas formações neoplásicas, causando aderência em camadas mais profundas, possivelmente pela maior quantidade de tecido mamário presente nessas mamas. Este achado é, comumente, relacionado com uma menor sobrevida (CHOI; YOON; JEONG, 2016; FRANZONI et al., 2017). Porém, igualmente às anteriores, não foi detectada correlação desta variável com a sobrevida dos animais.

Em relação aos aspectos microscópicos, alguns estudos avaliaram os subtipos e graduação histológica dos carcinomas mamários como valor prognóstico para os felinos. Apesar da literatura demonstrar dados discordantes entre si, os resultados ressaltam a importância desses parâmetros para a sobrevida dos felinos (MISDORP, 1999; ELSTON; ELLIS, 2002; SEIXAS et al., 2011; SOARES et al., 2016a). Diversos estudos demonstram que os subtipos histológicos não apresentam valor prognóstico (MISDORP, 1999; ORDÁS et al., 2004; SOARES et al., 2016a). No presente estudo, o subtipo cribiforme foi o mais prevalente, como relatado por MISDORP (2002), porém sem associação com a sobrevida. Com relação a graduação histológica, o sistema de Nottingham é amplamente utilizado para neoplasias felinas, sendo fortemente sugerido como fator prognóstico (SEIXAS et al., 2011). Neste estudo, a graduação III foi a mais frequente, entretanto, apesar de ser o grau presuntivamente mais agressivo, não representou um impacto na sobrevida em comparação aos graus I e II. Na classificação proposta por MILLS et al. (2015), sistema desenvolvido especificamente para felinos, a presente população demonstrou maior frequência de tumores com grau intermediário (grau II). Nesse estudo, os casos foram avaliados e comparados nos

dois sistemas de graduação histológica, não sendo observada correlação do grau de malignidade com impacto direto na sobrevida destes animais.

O subtipo molecular com maior frequência nesta casuística foi o triplo negativo “normal-like”, equivalente aos dados achados na literatura para pacientes humanos. (DOWSETT et al., 2009; KAUR et al., 2012; WIESE et al., 2013). O segundo subtipo de pior prognóstico é padrão luminal B HER2 (positivo ou negativo), o qual tem maior risco de recorrência, menor sobrevida e maior resistência aos quimioterápicos. (DOWSETT et al., 2009). No presente estudo, o subtipo molecular luminal B HER2 negativo foi o segundo mais frequente, concordante com a literatura em pacientes humanos, mas discordante com sua influência na sobrevida. Não foram encontradas diferenças significativas entre os subtipos moleculares e a sobrevida dos animais, o que pode refletir uma baixa representação amostral, principalmente em alguns subtipos em especial. O marcador de proliferação celular Ki-67 também se apresenta como um marcador confiável para o prognóstico de uma grande variedade de neoplasias. Neste estudo, a grande maioria dos carcinomas mamários (95,7%) apresentaram valores de Ki-67 superiores ou iguais ao *cut-off* de 14%, recentemente estabelecido como fator prognóstico em tumores mamários felinos (SOARES et al., 2016b). Ainda, o índice de proliferação celular aumentou proporcionalmente em relação à graduação pelo sistema de Nottingham (ELSTON; ELLIS, 1991). Porém, este fenômeno não foi evidenciado na comparação com os subtipos moleculares, assim como também não houve associação com a sobrevida dos animais.

Diversos autores sugerem que a Cx43 é expressa em abundância nos tecidos neoplásicos e que sua redução está correlacionada com a progressão tumoral, a perda da comunicação intercelular via junções do tipo GAP, sendo este, um evento precoce de progressão à malignidade (KANCZUGA-KODA et al., 2006; LOSSO, 2008). No presente estudo, a maioria dos carcinomas mamários felinos (78,3%) apresentou baixa imunoexpressão citoplasmática da Cx43. Ainda, o subtipo histológico cribiforme apresentou maior imunoexpressão em comparação aos demais subtipos, sugerindo um maior grau de malignidade nestes tumores. Estes dados corroboram o estudo de POYET et al. (2015), no qual os autores relataram uma alta expressão da Cx43 em tumores com alta proliferação celular. Também foi observada uma correlação da imunoexpressão da Cx43 com a graduação histológica pelo sistema de Nottingham (ELSTON; ELLIS, 1991), indicando uma maior expressão nos

tumores com maiores graus de malignidade (graus II e III). Estes dados sugerem sua participação na progressão tumoral, indicando-a como uma possível ferramenta prognóstica nos tumores mais avançados. Por fim, os carcinomas triplo negativos “basal-like”, conhecidos por apresentarem pior prognóstico em mulheres e gatas, apresentaram maior imunoexpressão da Cx43. Apesar de não haver correlação direta com a sobrevida, estes dados sugerem a participação da Cx43 nos eventos de progressão tumoral, estando associados, portanto, com uma pior evolução dos carcinomas mamários em felinos.

6 CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que a grande maioria dos carcinomas mamários em felinos apresentaram baixa imunexpressão da Cx43, sem associação direta com a sobrevida nesta casuística. Porém, sua imunexpressão demonstrou correlação com características associadas à uma maior malignidade, como graduação histológica e subtipos histológico e molecular mais agressivos. Dessa maneira, estes achados sugerem que a presença da Cx43 nos carcinomas mamários pode indicar um pior prognóstico devido sua associação com os eventos de progressão tumoral.

REFERÊNCIAS

- CASTAGNARO, M. et al. Tumour grading and the one-year post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. **Journal of comparative pathology**, v. 119, n. 3, p. 263–275, 1998.
- CHOI, J.-W.; YOON, H.-Y.; JEONG, S.-W. Clinical outcomes of surgically managed spontaneous tumors in 114 client-owned dogs. **Immune network**, v. 16, n. 2, p. 116–125, 2016.
- CONTESSO, G. et al. The importance of histologic grade in long-term prognosis of breast cancer: a study of 1,010 patients, uniformly treated at the Institut Gustave-Roussy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 5, n. 9, p. 1378–1386, 1987.
- CUNHA, S. et al. Survival and disease-free interval of cats with mammary carcinoma treated with chain mastectomy. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, p. 1–8, 2016.
- DAGLI, M. L. Z.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J. Roles of gap junctions and connexins in non-neoplastic pathological processes in which cell proliferation is involved. **Journal of Membrane Biology**, v. 218, n. 1–3, p. 79–91, 2007.
- DE MARIA, R. et al. 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.
- DORN, C. R. et al. Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 40, n. 2, p. 307–318, 1968.
- DOWSETT, M. et al. Meta-analysis of breast cancer outcomes in adjuvant trials of aromatase inhibitors versus tamoxifen. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 3, p. 509–518, 2009.
- ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. 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. CW Elston & IO Ellis. *Histopathology* 1991; 19; 403–410: AUTHOR COMMENTARY. **Histopathology**, v. 41, n. 3a, p. 151, 2002.
- ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato. **afecções do estômago. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara**

Koogan, p. 1583–1614, 2004.

FRANZONI, M. S. et al. CARCINOMA MAMÁRIO MICROPAPILAR METASTÁTICO EM CADELA ASSOCIADO COM SOBREVIVÊNCIA DE 306 DIAS. **INVESTIGAÇÃO**, v. 16, n. 1, 2017.

GIMÉNEZ, F. et al. 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.

GIORDANO, S. H.; HORTOBAGYI, G. N. Inflammatory breast cancer: clinical progress and the main problems that must be addressed. **Breast Cancer Research**, v. 5, n. 6, p. 284, 2003.

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

HANSEN, K.; KHANNA, C. Spontaneous and genetically engineered animal models: Use in preclinical cancer drug development. **European Journal of Cancer**, v. 40, n. 6, p. 858–880, 2004.

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, A. A.; MOONEY, S. Feline mammary tumors. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 15, n. 3, p. 513–520, 1985.

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

HOPTON, D. S. et al. Histological grading of breast cancer; significance of grade on recurrence and mortality. **European journal of surgical oncology: the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology**, v. 15, n. 1, p. 25–31, 1989.

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

ITO, T. et al. Prognosis of malignant mammary tumor in 53 cats. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 58, n. 8, p. 723–726, 1996.

KANCZUGA-KODA, L. et al. Increased expression of connexins 26 and 43 in lymph node metastases of breast cancer. **Journal of clinical pathology**, v. 59, n. 4, p. 429–433, 2006.

KAUR, P. et al. A mouse model for triple-negative breast cancer tumor-initiating cells (TNBC-TICs) exhibits similar aggressive phenotype to the human disease. **BMC cancer**, v. 12, n. 1, p. 120, 2012.

KHANNA, C. et al. The dog as a cancer model. **Nature biotechnology**, v. 24, n. 9, p. 1065–6, 2006.

KOPERA, I. et al. Differential expression of connexin 43 in adult pig testes during normal spermatogenic cycle and after flutamide treatment. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 6, p. 1050–1060, 2011.

KRUTOVSKIKH, V.; MIRONOV, N.; YAMASAKI, H. Human connexin 37 is polymorphic but not mutated in tumours. **Carcinogenesis**, v. 17, n. 8, p. 1761–1763, 1996.

LAZARETTI, A. P. et al. Prevalência dos Subtipos Moleculares Específicos do Câncer de Mama em pacientes atendidas em um Serviço de Alta Complexidade e Demanda do Sul de Santa Catarina de 2006 a 2014. **Blucher Medical Proceedings, São Paulo**, v. 2, n. 7, p. 144–148, 2016.

LOSSO, J. N. The biochemical and functional food properties of the Bowman-Birk inhibitor. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 48, n. 1, p. 94–118, 2008.

MANISCALCO, L. et al. Activation of AKT in feline mammary carcinoma: a new prognostic factor for feline mammary tumours. **The Veterinary Journal**, v. 191, n. 1, p. 65–71, 2012.

MATOS, A. J. F. et al. Prognostic studies of canine and feline mammary tumours: the need for standardized procedures. **The veterinary journal**, v. 193, n. 1, p. 24–31, 2012.

MILLANTA, F. et al. Steroid hormone receptors in normal, dysplastic and neoplastic feline mammary tissues and their prognostic significance. **Veterinary record**, v. 158, n. 24, p. 821–824, 2006.

MILLS, S. W. et al. 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. Histological classification of the mammary tumors of the dog and the cat. **World Health Organization International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals second series**, v. 7, p. 1–59, 1999.

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.

ORDÁS, J. et al. Immunohistochemical expression of progesterone receptors, growth hormone and insulin growth factor-I in feline fibroadenomatous change. **Research in veterinary science**, v. 76, n. 3, p. 227–233, 2004.

ORDÁS, J. et al. Proto-oncogene HER-2 in normal, dysplastic and tumorous feline mammary glands: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. **BMC cancer**, v. 7, n. 1, p. 179, 2007.

OVERLEY, Beth et al. Association between ovariectomy and feline mammary carcinoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 19, n. 4, p. 560-563, 2005.

PLANTE, M. et al. The vaginal radical trachelectomy: an update of a series of 125 cases and 106 pregnancies. **Gynecologic oncology**, v. 121, n. 2, p. 290–297, 2011.

POYET, C. et al. Connexin 43 expression predicts poor progression-free survival in patients with non-muscle invasive urothelial bladder cancer. **Journal of clinical pathology**, v. 68, n. 10, p. 819–824, 2015.

QUEIROGA, F.; LOPES, C. **Tumores mamários caninos, pesquisa de novos factores de prognóstico Canine mammary tumours, research on new prognostic factors**Rpcv, , 2002. .

RASOTTO, R. et al. 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. et al. Mammary invasive micropapillary carcinoma in cats: clinicopathologic features and nuclear DNA content. **Veterinary pathology**, v. 44, n. 6, p. 842–848, 2007.

SEIXAS, F. et al. 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.

SOARES, M. et al. Molecular based subtyping of feline mammary carcinomas and clinicopathological characterization. **The Breast**, v. 27, p. 44–51, 2016a.

SOARES, M. et al. 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, 2016b.

VINKEN, M. et al. Connexins and their channels in cell growth and cell death. **Cellular signalling**, v. 18, n. 5, p. 592–600, 2006.

WEIJER, K. et al. Feline malignant mammary tumors. I. Morphology and biology: some comparisons with human and canine mammary carcinomas. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 49, n. 6, p. 1697–1704, 1972.

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

WIESE, D. A. et al. Feline mammary basal-like adenocarcinomas: a potential model for human triple-negative breast cancer (TNBC) with basal-like subtype. **BMC cancer**, v. 13, n. 1, p. 403, 2013.

YAMASAKI, H. Gap junctional intercellular communication and carcinogenesis. In: **Parallels in Cell to Cell Junctions in Plants and Animals**. [s.l.] Springer, 1990. p. 115–127.