LUIZ ROBERTO BIONDI

Neoplasias mamárias caninas: alterações genéticas e epigenéticas
e sua correlação com tipo histológico e prognóstico

São Paulo

2014

LUIZ ROBERTO BIONDI

Neoplasias mamárias caninas: alterações genéticas e epigenéticas e sua correlação com tipo histológico e prognóstico

Tese 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 Doutor em Ciências

Departamento:
Patologia

Área de concentração:
Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:
Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli

De acordo: _____
Orientador(a)

São Paulo
2014

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.2942
FMVZ

Biondi, Luiz Roberto
Neoplasias mamárias caninas: alterações genéticas e epigenéticas e sua correlação com
tipo histológico e prognóstico / Luiz Roberto Biondi. -- 2014.
235 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli.

1. Marcadores tumorais. 2. 5 MeCyt. 3. GATA3. 4. Metilação global. 5. FGFR2. I. Título.

São Paulo, 30 de janeiro de 2014
CEUA N 1823251013

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a): Luiz Roberto Biondi

Executante: Luiz Roberto Biondi

Depto/Disc: Vpt/Laboratório De Oncologia Experimental E Comparada

Pesquisadores associados: Luciana Boffoni Gentile (fmvz/usp); Profa Dra Maria Lucia Zaidan Dagli (orientador)

Título do projeto: "Neoplasias mamárias caninas: alterações genéticas e epigenéticas e sua correlação com tipo histológico e prognóstico".

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

Anexar documento da Faculdade referente a autorização de uso das amostras.

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, na reunião de 16/01/2014, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Atenciosamente,

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BIONDI, Luiz Roberto

Título: **Neoplasias mamárias caninas:** alterações genéticas e epigenéticas e sua correlação com tipo histológico e prognóstico

Tese 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 Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

À **Patrícia**, meu amor! O que dizer de
alguém do qual você é incapaz de
imaginar um só dia de sua vida sem ele?
Eu te amo, eu te amo, eu te amo!

Ao meu amigão **Felipe** e à minha
“amora” **Bruna**. Pedacinhos do céu que
Deus colocou, aqui na Terra, pra
iluminar minha vida. Amo muito vocês!

Aos meus pais, **Franco e Neide** que dedicam a mim até hoje o mesmo cuidado dos primeiros passos, as mesmas preocupações com os primeiros tombos e a mesma alegria das primeiras conquistas

Aos meus irmãos amados: **Bete, Giancarlo e Gianfranco**, com quem aprendi o verdadeiro significado da palavra família

À minha querida orientadora, **Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli**, Malu, por sua orientação sábia, carinhosa e compreensiva, mas, sobretudo, por seu desejo constante de crescimento aos que estão ao seu redor

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, onde conheci mestres inesquecíveis e me preparou para minhas conquistas.
Aos professores e funcionários, minha eterna gratidão

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli, que muito mais que me permitir à obtenção de um título, me colocou, com todas as oportunidades que me ofereceu, dentro do cenário da Oncologia Veterinária Brasileira

Aos Mantenedores da Universidade Metropolitana de Santos, Dra. Renata Garcia de Siqueira Viegas e Rubens Flávio de Siqueira Viegas Filho, pela confiança depositada em mim e pela oportunidade que me foi dada

Ao Prof. Dr. Daniel Carreira Filho, Pró-Reitor Acadêmico da UNIMES, pelo incentivo e compreensão na difícil tarefa de conciliar as obrigações de trabalho com as obrigações da pós-graduação

Ao Prof. Vicente Borelli, por seus ensinamentos, incentivo e apoio para que eu me iniciasse na pós-graduação.

À Luciana Boffoni Gentile, a Lu, por dividir comigo a bancada, as conquistas, as frustrações e principalmente, seus conhecimentos de como fazer ciência

À Profa. Dra. Renne Laufer Amorin e sua equipe, por dar sentido a este trabalho, ao conseguir a marcação imunoistoquímica de ER α em meu material

À Marguiti, por sua paciência ao mostrar passo a passo o mundo da imunoistoquímica e por todas as vezes que me socorreu e me ajudou nas centenas de lâminas deste trabalho

Às minhas colegas e amigas Paola Monte Alegre Américo e Nathalia Pisciotano Noronha, por sua ajuda na colheita do material e pela tranquilidade em saber que o Hospital estava em boas mãos, nos momentos de minhas ausências.

Aos amigos do Laboratório de Oncologia Experimental, Lucas, Ivone, Tereza e Daniel, por todo incentivo e ensinamentos que ajudaram na conquista de meus resultados e Marcello Tedardi pelo laborioso trabalho de geoprocessamento e

confeção do mapa de distribuição dos domicílios dos animais atendidos pelo HOVET

Aos amigos da ABROVET, Adriana, Carol, Kátia, Rodrigo e Tarso pelo apoio, incentivo e compreensão

Às funcionárias da secretaria do HOVET UNIMES, Cláudia e Renata, por sua incrível ajuda na busca dos dados dos animais e dos prontuários médicos

Aos amigos e colegas de trabalho da UNIMES que me ajudaram com sua dedicação a superar sem problemas os momentos em que me afastei da Instituição

A todos os cães incluídos no estudo, e seus proprietários, pela contribuição, dedicação e paciência.

À Sophie e à Ágata que, com seu amor puro e verdadeiro, me abastecem com momentos de alegria e descontração. À Mila, Cauã, Léo, Nina e Risa, que também deixaram suas marcas em meu coração.

À minha mulher Patrícia, por pelo meio milhão de cliques no mouse, contando as células de metilação e meus filhos Felipe e Bruna, por enfrentarem o mau humor de alguns proprietários, no acompanhamento telefônico de sobrevida dos animais. Em fim, por seu incentivo, compreensão e por suportarem, pela segunda vez a célebre frase cunhada pela Patrícia: “só depois do doutorado”!

A Deus,

Nunca pedi tanto pra que o tempo voltasse, parasse, andasse mais devagar...
...nunca ele caminhou tão rápido.

Porém, nunca me senti tão inspirado, com saúde e energia pra enfrentar meus
desafios

Ele sempre nos atende, à Sua maneira, é claro!

RESUMO

BIONDI, L. R. **Neoplasias mamárias caninas**: alterações genéticas e epigenéticas e sua correlação com tipo histológico e prognóstico. [Canine mammary tumors: genetic and epigenetic alterations and their correlation with histologic type and prognosis]. 2014. 235 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Os tumores de glândula mamária, à semelhança do que ocorre na espécie humana, são as neoplasias que mais comumente acometem as fêmeas caninas, sendo os cães apontados como importante modelo de estudo desta doença. Com cerca da metade dos tumores mamários caninos considerados malignos, um problema crucial no manejo deste tipo de neoplasia é a busca por fatores prognósticos que auxiliem na escolha do tratamento adjuvante e na predição do curso clínico da doença, uma vez que neoplasias de baixo grau de malignidade, podem apresentar curso agressivo, contrariando os indicadores prognósticos clínicos usuais. Este trabalho teve por objetivo estudar alterações genéticas e epigenéticas em neoplasias mamárias de fêmeas caninas, buscando também avaliar seu valor prognóstico de sobrevida. Para tanto, neoplasias mamárias espontâneas de cães foram colhidas e classificadas de acordo com o tipo e grau histológico, além do imunofenótipo, obtido da marcação de ER α , PR, HER2 e Ki67. O padrão de metilação global do DNA e o perfil de expressão gênica dos marcadores tumorais BRCA1, BRCA2, ERR α , ERR β , ERR γ , FGFR2 e GATA3 foram correlacionados com aqueles parâmetros. Para o estudo do padrão de metilação global do DNA foram utilizados 109 fragmentos de tecido mamário neoplásico, conservados em parafina, oriundos do arquivo do Hospital Veterinário da Universidade Metropolitana de Santos. Para imunofenotipagem e estudo imunoistoquímico da expressão de BRCA1, BRCA2, ERR α , ERR β , ERR γ , FGFR2 e GATA3 foram colhidos em estudo prospectivo 78 fragmentos de tecido mamário neoplásico e não neoplásico, provenientes de 70 fêmeas da espécie canina com diagnóstico clínico de neoplasia mamária e que foram submetidas a tratamento cirúrgico. O material assim obtido foi conservado em nitrogênio líquido, para os estudos de expressão de RNAm por qPCR e em blocos de parafina, para os estudos histopatológicos e imunoistoquímicos. O estadiamento clínico mostrou-se fator prognóstico importante, assim como diâmetro tumoral, grau

histológico do tumor, uso de quimioterapia adjuvante e recorrência. Os estudos epigenéticos demonstraram que o padrão de metilação do DNA independe do tipo histológico do tumor e de seu grau histológico, guardando correlação apenas com o grau de malignidade dos tumores; no entanto, este marcador demonstrou-se interessante previsor de recidiva tumoral, com diferença estatística significativa entre os animais que apresentaram recidiva e aqueles que não a apresentaram. Nos estudos de imunofenotipagem, foi possível observar por meio da técnica de imunoistoquímica que, tanto a expressão de ER α quanto de PR nas fêmeas caninas guardam, à semelhança da mulher, relação com o estado reprodutivo e hormonal das pacientes. Também foi observado que os marcadores ER α , PR e HER2 em sua maioria se correlacionam com o tipo e grau histológico quando transformados em variável categórica; porém, não apresentam valor prognóstico de sobrevida. No entanto, Ki67 demonstrou forte correlação com tipo e grau histológico dos tumores, com a presença de linfonodos positivos e metástase pulmonar, apresentando-se como fator prognóstico independente nas neoplasias mamárias caninas. Na busca por candidatos a marcadores tumorais, observou-se que, em sua maioria, os marcadores BRCA1, BRCA2, ER α , ER β , ER γ , FGFR2 e GATA3 não apresentaram correlação com tipo e grau histológico do tumor; porém, FGFR2 mostrou-se fator prognóstico de sobrevida para as fêmeas caninas portadoras de neoplasia. A finalidade de estudos integrados que correlacionem aspectos clínicos, morfológicos e moleculares das neoplasias é avançar em seu conhecimento e obter novas perspectivas para o sucesso no tratamento destas doenças. Esperamos que, com este trabalho, tenhamos contribuído para atingir estes objetivos.

Palavras-chave: Marcadores tumorais. 5 MeCyt. GATA3. metilação global. FGFR2.

ABSTRACT

BIONDI, L. R. **Canine mammary tumors:** genetic and epigenetic alterations and their correlation with histologic type and prognosis. [Neoplasias mamárias caninas: alterações genéticas e epigenéticas e sua correlação com tipo histológico e prognóstico.]. 2014. 235 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Tumors of the mammary gland, similar to what occurs in the human species, are the most common cancers that affect the female dogs, being this species pointed out as an important model for the study of this disease. With about half of canine mammary tumors considered malignant, a crucial issue in the management of this type of cancer is the search for prognostic factors that assist in the choice of adjuvant therapy and in predicting the clinical course of the disease, since low-grade neoplasms malignancy can present aggressive course, contrary to the usual clinical prognostic indicators. This work aimed to study genetic and epigenetic changes in mammary tumors in female dogs, seeking also to evaluate its prognostic value for survival. For this purpose, spontaneous mammary tumors of dogs were collected and classified according to the histological type and grade, plus the immunophenotype obtained by evaluating ER α , PR, HER2 and Ki67. The pattern of global DNA methylation and gene expression of tumor markers BRCA1, BRCA2, ER α , ER β , ER γ , FGFR2 and GATA3 profile were correlated with those parameters. Pattern of DNA global methylation was studied in 109 formalin-fixed paraffin-embedded neoplastic mammary tissue, obtained from the archives of the Veterinary School Hospital of the Universidade Metropolitana de Santos. Immunophenotyping and immunohistochemical study of the expression of BRCA1, BRCA2, ER α , ER β , ER γ , FGFR2 and GATA3 were performed in a prospective study with 78 fragments of neoplastic and non-neoplastic mammary tissue from 70 female dogs, with clinical diagnosis of mammary cancer and that underwent surgical treatment. The material was stored in liquid nitrogen for studies of mRNA expression by qPCR and in paraffin for histopathological and immunohistochemical studies. Clinical staging was an important prognostic factor, as well as tumor size, histological and tumor grade, use of adjuvant chemotherapy and recurrence. Epigenetic studies have shown that the pattern of DNA methylation is independent of the histological

and tumor grade, keeping, however, correlation with the degree of malignancy of the tumors and interesting predictor value for tumor recurrence. Immunophenotyping studies showed that both ER α and PR expression, like in women, presented correlation with reproductive and hormonal status of the patients. It was also observed that ER α , PR and HER2 tumor markers mostly correlate with histological type and grade when considered a categorical variable, but they have not shown any prognostic survival value. However Ki67 showed strong correlation with histological type and grade of the tumors, the presence of positive lymph nodes and lung metastasis, and can be considered an independent prognostic factor in canine mammary tumors. In search for candidates for tumor markers, we found that, mostly BRCA1, BRCA2, ER α , ER β , ER γ , FGFR2 and GATA3 markers showed no correlation with histological type and grade of the tumor, although FGFR2 showed prognostic survival value for female dogs affected by breast cancer. The purpose of integrated studies correlating clinical, morphological and molecular aspects of cancer is to gain further knowledge and to glimpse new perspectives for success in treating these diseases. We hope that with this work, we have contributed to achieve these goals.

Keywords: Tumor marker. 5 MeCyt. GATA3. global methylation. FGFR2.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

- Figura 1 - Distribuição geoespacial dos domicílios dos animais atendidos pelo Hospital Veterinário da UNIMES, com diagnóstico de neoplasia mamária, durante o período de aquisição de 2005 a 2010; n = 161 animais – São Paulo – 2014..... 53
- Figura 2 - Imagens 2A e 2B - fêmeas portadoras de nódulos mamários de diferentes tamanhos. Imagem 2C - animal com diagnóstico clínico e histopatológico de carcinoma inflamatório. Imagem 2D - animal com metástase cutânea de neoplasia mamária, diagnosticada com exame citológico por biópsia aspirativa com agulha fina. Fonte: imagens 2A, 2B E 2C – arquivo pessoal de Paola Monte Alegre Américo; Imagem 2D - Luiz Roberto Biondi – São Paulo 2014..... 59
- Figura 3 - Imagem de fêmea canina portadora de doença mamária neoplásica composta por diversos tumores ulcerados e hemorrágicos e sua resolução cirúrgica no pós-operatório imediato. Fotomontagem realizada por sua autora, Paola Monte Alegre Américo – São Paulo - 2014..... 61

Capítulo 3

- Figura 4 - Imagens fotográficas de padrões de imunorreatividade de ER α de lâminas de corte histológico de tecido neoplásico ou mamário, obtidas com câmara digital acoplada à ocular de microscópio de luz. Magnitude equivalente a 400x. Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental da FMVZ/USP – São Paulo – 2014..... 93
- Figura 5 - Imagens fotográficas de padrões de imunorreatividade de PR de lâminas de corte histológico de tecido neoplásico ou mamário, obtidas com câmara digital acoplada à ocular de microscópio de luz. Magnitude equivalente a 400x. Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental da FMVZ/USP – São Paulo – 2014..... 101
- Figura 6 - Imagens fotográficas de padrões de imunorreatividade de Ki67 de lâminas de corte histológico de tecido neoplásico ou mamário, obtidas com câmara digital acoplada à ocular de microscópio de luz. Magnitude equivalente a 400x. Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental da FMVZ/USP – São Paulo – 2014..... 109

Figura 7 -	Imagens fotográficas de padrões de imunorreatividade de HER2 de lâminas de corte histológico de tecido neoplásico ou mamário, obtidas com câmara digital acoplada à ocular de microscópio de luz. Magnitude equivalente a 400x. Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental da FMVZ/USP – São Paulo – 2014.....	117
------------	--	-----

Capítulo 4

Figura 8 -	Imagens fotográficas de padrões de imunorreatividade de BRCA2 de lâminas de corte histológico de tecido neoplásico ou mamário, obtidas com câmara digital acoplada à ocular de microscópio de luz. Magnitude equivalente a 400x. Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental da FMVZ/USP – São Paulo – 2014.....	162
Figura 9 -	Imagens fotográficas de padrões de imunorreatividade de ER α de lâminas de corte histológico de tecido neoplásico ou mamário, obtidas com câmara digital acoplada à ocular de microscópio de luz. Magnitude equivalente a 400x. Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental da FMVZ/USP – São Paulo – 2014.....	166
Figura 10 -	Imagem fotográfica de marcação citoplasmática granular típica (setas) de FGFR2 – São Paulo – 2014.....	173
Figura 11 -	Imagens fotográficas de padrões de imunorreatividade de FGFR2 de lâminas de corte histológico de tecido neoplásico ou mamário, obtidas com câmara digital acoplada à ocular de microscópio de luz. Magnitude equivalente a 400x. Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental da FMVZ/USP – São Paulo – 2014.....	174
Figura 12 -	Imagens fotográficas de padrões de imunorreatividade de GATA3 de lâminas de corte histológico de tecido neoplásico ou mamário, obtidas com câmara digital acoplada à ocular de microscópio de luz. Magnitude equivalente a 400x. Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental da FMVZ/USP – São Paulo – 2014.....	179

Capítulo 5

- Figura 13A - Imagens fotográficas de padrões de imunorreatividade de 5MeCyt de lâminas de corte histológico de tecido neoplásico ou mamário, obtidas com câmara digital acoplada à ocular de microscópio de luz. Magnitude equivalente a 400x. Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental da FMVZ/USP – São Paulo – 2014..... 217
- Figura 13B - Imagens fotográficas de padrões de imunorreatividade de 5MeCyt de lâminas de corte histológico de tecido neoplásico ou mamário, obtidas com câmara digital acoplada à ocular de microscópio de luz. Magnitude equivalente a 400x. Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental da FMVZ/USP – São Paulo – 2014..... 218
- Figura 14 - Imagens fotográficas de padrões de imunorreatividade de 5MeCyt de lâminas de corte histológico de tecido neoplásico ou mamário, obtidas com câmara digital acoplada à ocular de microscópio de luz. Magnitude equivalente a 400x. Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental da FMVZ/USP – São Paulo – 2014..... 219

LISTA DE GRÁFICOS

Capítulo 2

Gráfico 1 -	Curva de Kaplan-Meier de probabilidade de sobrevida após mastectomia em função do grau histológico tumoral como fator prognóstico. Teste log-rank (Mantel-Cox) - $P < 0,0001$; $X^2 = 22,30$ GL = 2. Carcinoma ductal in situ não foi incluído; n = 150 animais - São Paulo – 2014.....	55
Gráfico 2 -	Curva de Kaplan-Meier de probabilidade de sobrevida após mastectomia em função do tipo histológico tumoral como fator prognóstico. Teste log-rank (Mantel-Cox) - $P = 0,3109$; $X^2 = 5,952$ GL = 3. Carcinoma ductal in situ não foi incluído; n = 150 animais - São Paulo – 2014.....	55
Gráfico 3 -	Curva de Kaplan-Meier de probabilidade de sobrevida após mastectomia em função da idade ao diagnóstico como fator prognóstico. Teste log-rank (Mantel-Cox) - $P < 0,05$; $X^2 = 7,778$ GL = 2; n = 152 animais - São Paulo – 2014.....	57
Gráfico 4 -	Curva de Kaplan-Meier de probabilidade de sobrevida após mastectomia em função do diâmetro máximo do tumor como fator prognóstico. Teste log-rank (Mantel-Cox) - $P < 0,05$; $X^2 = 12,5$ GL = 1; n = 152 - São Paulo – 2014.....	58
Gráfico 5 -	Curva de Kaplan-Meier de probabilidade de sobrevida após mastectomia em função do estadiamento clínico baseado no método da Organização Mundial de saúde - WHO TNM como fator prognóstico (n=152). Teste log-rank (Mantel-Cox) - $P < 0,05$; $X^2 = 9,700$ GL = 2; Devido ao número não significativo de animais com estágio 2, este grupo foi incorporado ao estágio 1 para efeito de análise estatística; n = 152 animais - São Paulo – 2014.....	60
Gráfico 6 -	Curva de Kaplan-Meier de probabilidade de sobrevida após mastectomia em função de quimioterapia adjuvante ou neoadjuvante como fator prognóstico. Teste log-rank (Mantel-Cox) - $P < 0,05$; $X^2 = 6,650$ GL = 1; n = 152 animais - São Paulo – 2014.....	61
Gráfico 7 -	Curva de Kaplan-Meier de probabilidade de sobrevida após mastectomia em função da recidiva ou nova apresentação do tumor como fator prognóstico. Teste log-rank (Mantel-Cox) - $P < 0,0001$; $X^2 = 40,26$ GL = 1; n = 152 animais - São Paulo – 2014.....	62

Capítulo 3

Gráfico 8 -	Curva de Kaplan-Meier de fração de sobrevida em função do estadiamento segundo sistema TNM considerando-se a data da mastectomia evento inicial e a morte por neoplasia mamária maligna evento final. Teste log-rank de Mantel-Cox: $P < 0,0001$; Teste tendência de Logrank: $P < 0,05$ $n = 61$ animais; I, II, III, IV e V = estágio clínico segundo sistema TNM – São Paulo – 2014.....	86
Gráfico 9 -	Curva de Kaplan-Meier de fração de sobrevida em relação ao tipo histológico tumoral considerando-se a data da mastectomia evento inicial e a morte por neoplasia mamária maligna evento final. Teste log-rank de Mantel-Cox: $P > 0,05$; Teste tendência de Logrank: $P > 0,05$. $n = 61$ animais; Ca cplx – carcinoma complexo; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca tbp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido – São Paulo – 2014.....	88
Gráfico 10 -	Curva de Kaplan-Meier de fração de sobrevida em relação ao grau histopatológico tumoral considerando-se a data da mastectomia evento inicial e a morte por neoplasia mamária maligna evento final. Teste log-rank de Mantel-Cox: $P < 0,0001$; Teste tendência de Logrank: $P < 0,05$. $n = 61$ animais; GI, GII, GIII – grau histológico tumoral – São Paulo – 2014.....	89
Gráfico 11A -	Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade de ER α para detecção de valores atípicos (outliers). Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; $n = 78$ amostras tumorais – São Paulo – 2014.....	90
Gráfico 11B -	Gráfico da distribuição dos escores de imunorreatividade de PR para detecção de valores atípicos (outliers). Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; $n = 78$ amostras tumorais – São Paulo – 2014.....	90
Gráfico 11C -	Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade Ki67 para detecção de valores atípicos (outliers) no qual se notam a marcação de três valores fora da faixa de distribuição (33,7; 34,4; 47,9). Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; $n = 78$ amostras tumorais – São Paulo – 2014.....	91

Gráfico 12 -	Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade de ER α em forma de variável contínua (porcentagem de células imunorreativas em relação ao total de células contadas), agrupados em função do tipo histológico tumoral. Média do grupo controle (Ctrl) 47,11 $\pm$ 21,11 P < 0,05 IC de 95% ANOVA. Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; * diferença significativa (P < 0,05 no pós-teste de Dunnett de múltipla comparação) entre o grupo Ctrl e o grupo marcado com o mesmo sinal; Ctrl – controle; Ca cplx – carcinoma complexo; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca tbp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido; n = 78 amostras tumorais – São Paulo – 2014.....	94
Gráfico 13 -	Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade de ER α em forma de variável categórica (tumor positivo ou negativo conforme limite de corte: tumor positivo $\geq$ 10% de células positivas) e em função do tipo histológico tumoral. X ² = 19,00 P = 0,0019 GL = 5 e coeficiente de contingência de 0,44. X ² para tendência = 12,95 P = 0,0003 GL = 1. Ctrl – controle; Ca cplx – carcinoma complexo; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca tbp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido; n = 78 amostras – São Paulo – 2014.....	95
Gráfico 14 -	Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade de ER α em forma de variável contínua (porcentagem de células imunorreativas em relação ao total de células contadas), agrupados em função do grau histológico tumoral. Média do grupo controle (Ctrl) 47,11 $\pm$ 21,11 P = 0,0021 IC de 95% ANOVA. Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; * diferença significativa (P < 0,05 no pós-teste de Dunnett de múltipla comparação) entre o grupo Ctrl e o grupo marcado com o mesmo sinal. Ctrl – controle, GI, GII, GIII – grau histológico 1, 2 e 3; n = 78 amostras tumorais – São Paulo – 2014.....	97
Gráfico 15 -	Representação gráfica da distribuição dos escores de ER α em forma de variável categórica (tumor positivo ou negativo conforme limite de corte: tumor positivo $\geq$ 10% de células positivas) e em função do grau histopatológico tumoral. X ² = 25,55 P < 0,0001 GL = 3. X ² para tendência = 10,91 P = 0,001 GL 1 n = 78 amostras tumorais; Ctrl – controle; GI, GII, GIII – grau histológico – São Paulo – 2014.....	98

Gráfico 16A -	Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade de ER α em forma de variável contínua (porcentagem de células imunorreativas em relação ao total de células contadas), agrupados em função do estado reprodutivo do animal. Média dos animais castrados $24,77 \pm 17,63$ $P < 0,05$ IC 95% Teste t de Student. Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; n = 70 animais – São Paulo – 2014.....	99
Gráfico 16B -	Representação gráfica da distribuição dos escores de ER α em forma de variável categórica (tumor positivo ou negativo conforme limite de corte: tumor positivo $\geq 10\%$ de células positivas) e em função do estado reprodutivo do animal. $P < 0,05$ Teste Exato de Fisher. n = 70 animais – São Paulo – 2014.....	99
Gráfico 17 -	Curva de Kaplan-Meier de fração de sobrevida em função da imunorreatividade do marcador tumoral ER α considerando-se a data da mastectomia evento inicial e a morte por neoplasia mamária maligna evento final. Teste log-rank de Mantel-Cox: $P > 0,05$ $X^2 = 0,489$ GL 1; Fração de Risco (HR – Hazard ratio) = 0,6295 95% IC = 0,172 a 2,304. n = 61 animais – São Paulo – 2014.....	100
Gráfico 18 -	Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade de PR em forma de variável contínua (porcentagem de células imunorreativas em relação ao total de células contadas), agrupados em função do tipo histológico tumoral. Média do grupo controle (Ctrl) $48,73 \pm 19,28$. $P > 0,05$ IC de 95% ANOVA. Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; * diferença significativa ($P < 0,05$ no pós-teste de Dunnett de múltipla comparação) entre o grupo Ctrl e o grupo marcado com o mesmo sinal; Ctrl – controle; Ca cplx – carcinoma complexo; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca tbp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido; n = 78 amostras tumorais – São Paulo – 2014.....	103

Gráfico 19 -	Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade de PR em forma de variável contínua (porcentagem de células imunorreativas em relação ao total de células contadas), agrupados em função do grau histológico tumoral. Média do grupo controle (CTRL) $48,73 \pm 19,28$ $P > 0,05$ IC de 95% ANOVA. Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; * diferença significativa ($P < 0,05$ no pós-teste de Dunnett de múltipla comparação) entre o grupo Ctrl e o grupo marcado com o mesmo sinal. Ctrl – controle, GI, GII, GIII – grau histológico 1, 2 e 3; n = 78 amostras tumorais – São Paulo – 2014.....	104
Gráfico 20 -	Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade de PR em forma de variável categórica (tumor positivo ou negativo conforme limite de corte: tumor positivo $\geq 10\%$ de células positivas) e em função do tipo histológico tumoral. $X^2 = 13,95$ $P < 0,05$ GL = 3 n = 78 amostras tumorais; Ctrl – controle; Ca cplx – carcinoma complexo; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca tbp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido – São Paulo – 2014.....	105
Gráfico 21 -	Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade de PR em forma de variável categórica (tumor positivo ou negativo conforme limite de corte: tumor positivo $\geq 10\%$ de células positivas) e em função do grau histopatológico tumoral. $X^2 = 8,80$ $P < 0,05$ GL = 3 X^2 para tendência = $5,86$ $P < 0,05$ GL 1 n = 78 amostras tumorais; Ctrl – controle; GI, GII, GIII – grau histológico – São Paulo – 2014.	106
Gráfico 22A -	Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade de PR em forma de variável contínua (porcentagem de células imunorreativas em relação ao total de células contadas), agrupados em função do estado reprodutivo do animal. Média dos animais castrados $39,20 \pm 28,45$ $P > 0,05$ IC de 95% Teste t de Student. Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; n = 70 animais – São Paulo – 2014.....	107
Gráfico 22B -	Representação gráfica da distribuição dos escores de PR em forma de variável categórica (tumor positivo ou negativo conforme limite de corte: tumor positivo $\geq 10\%$ de células positivas) e em função do estado reprodutivo do animal. $P < 0,05$ Teste Exato de Fisher. n = 70 animais – São Paulo – 2014.....	107

Gráfico 23 -	Curva de Kaplan-Meier de fração de sobrevivência em função da imunorreatividade do marcador tumoral PR considerando-se a data da mastectomia evento inicial e a morte por neoplasia mamária maligna evento final. Teste log-rank de Mantel-Cox: $P > 0,05$ $X^2 = 0,431$ GL 1; Fração de Risco (HR – hazard ratio) não significativa. n = 61 animais – São Paulo – 2014.....	108
Gráfico 24 -	Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade de Ki67 em forma de variável contínua (porcentagem de células imunorreativas em relação ao total de células contadas), agrupados em função do tipo histológico tumoral. Média do grupo controle (Ctrl) $2,08 \pm 3,51$ $P < 0,05$ IC de 95% ANOVA. Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; * diferença significativa ($P < 0,05$ no pós-teste de Dunnett de múltipla comparação) entre o grupo Ctrl e o grupo marcado com o mesmo sinal; Ctrl – controle; Ca cplx – carcinoma complexo; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca tbp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido; n = 78 amostras tumorais – São Paulo – 2014.....	111
Gráfico 25 -	Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade de Ki67 em forma de variável contínua (porcentagem de células imunorreativas em relação ao total de células contadas), agrupados em função do grau histológico tumoral. Média do grupo controle (Ctrl) $2,08 \pm 3,51$ $P < 0,05$ IC de 95% ANOVA. Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; * diferença significativa ($P < 0,05$ no pós-teste de Dunnett de múltipla comparação) entre o grupo Ctrl e o grupo marcado com o mesmo sinal; • refere-se a valor atípico (outlier). Ctrl – controle, GI, GII, GIII – grau histológico 1, 2 e 3; n = 78 amostras tumorais – São Paulo – 2014.....	112
Gráfico 26 -	Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade de Ki67 em forma de variável categórica (tumor positivo ou negativo conforme limite de corte: tumor positivo $\geq 10\%$ de células positivas) e em função do tipo histológico tumoral. $X^2 = 20,39$ $P < 0,05$ GL 5 e coeficiente de contingência 0,46 n = 78 amostras tumorais; Ctrl – controle; Ca cplx – carcinoma complexo; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca tbp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido – São Paulo – 2014.....	113

Gráfico 27 -	Representação gráfica da distribuição dos escores de Ki67 em forma de variável categórica (tumor positivo ou negativo conforme limite de corte: tumor positivo $\geq 10\%$ de células positivas) e em função do grau histopatológico tumoral. $X^2 = 14,08$ $P = 0,0028$ GL 3 e X^2 para tendência = $9,751$ $P = 0,0018$ GL = 1 $n = 78$ amostras tumorais; Ctrl – controle; GI, GII, GIII – grau histológico – São Paulo – 2014.....	114
Gráfico 28 -	Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade de Ki67 em forma de variável contínua (porcentagem de células imunorreativas em relação ao total de células contadas), agrupados em função da presença de metástase pulmonar ou em linfonodo regional. Média do grupo controle (Ctrl) $2,08 \pm 3,51$ $P < 0,0001$ IC de 95% ANOVA. Na representação em boxplot, a caixa representa os percentis de 25 a 75%, a linha horizontal cheia representa a média do grupo, as barras horizontais os limites superior e inferior do intervalo de confiança; * refere diferença significativa no pós-teste de Dunnett de múltipla comparação entre o grupo Ctrl e o grupo marcado com o mesmo sinal; $n = 28$ animais; Ctrl – controle – São Paulo – 2014.....	115
Gráfico 29 -	Curva de Kaplan-Meier de fração de sobrevida em função da imunorreatividade do marcador tumoral Ki67, considerando-se a data da mastectomia evento inicial e a morte por neoplasia mamária maligna evento final. Teste log-rank de Mantel-Cox: $P < 0,05$ $X^2 = 4,57$ GL 1; Fração de Risco (HR – hazard ratio) = $3,24$ 95% IC = $1,27$ a $9,322$. $n = 61$ animais – São Paulo – 2014.....	116
Gráfico 30 -	Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade de HER2 em forma de variável categórica (tumor positivo = escore 3+; tumor negativo = escores 2+, 1+ ou zero) e em função do tipo histológico tumoral. $X^2 = 14,23$ $P < 0,05$ GL 5 $n = 78$ amostras tumorais; Ctrl – controle; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca tbp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido – São Paulo – 2014.....	118
Gráfico 31 -	Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade de HER2 em forma de variável categórica (tumor positivo = escore 3+; tumor negativo = escores 2+, 1+ ou zero) e em função do grau histológico tumoral. $X^2 = 4,683$ $P > 0,05$ GL 3 $n = 78$ amostras tumorais; Ctrl – controle; GI, GII, GIII – grau histológico – São Paulo – 2014.....	119

Gráfico 32 -	Curva de Kaplan-Meier de fração de sobrevida em função da imunorreatividade marcador tumoral HER2, considerando-se a data da mastectomia evento inicial e a morte por neoplasia mamária maligna evento final. Teste log-rank de Mantel-Cox: $P > 0,05$ $X^2 = 4,57$ GL 1; Fração de Risco (HR – hazard ratio) não significativa. n = 61 animais – São Paulo – 2014.....	120
Gráfico 33 -	Curva de Kaplan-Meier de fração de sobrevida em função da classificação molecular dos tumores com base na proposta de Sassi et al (2010) - CMSa, considerando-se a data da mastectomia evento inicial e a morte por neoplasia mamária maligna evento final. Teste log-rank de Mantel-Cox: $P < 0,05$ n = 61 animais – São Paulo – 2014.....	121
Gráfico 34 -	Curva de Kaplan-Meier de fração de sobrevida em função da classificação molecular dos tumores com base na proposta de Goldhirsch et al. (2011), considerando-se a data da mastectomia evento inicial e a morte por neoplasia mamária maligna evento final. Teste log-rank de Mantel-Cox: $P < 0,05$ n = 61 animais – São Paulo – 2014.....	124

Capítulo 4

Gráfico 35 -	Representação gráfica do quociente da expressão dos tumores ($2\Delta Ct$ alvo) para BRCA2 agrupados por tipo histológico e em função da expressão do grupo controle ($2\Delta Ct$ controle). Média do grupo controle (Ctrl) $1,00 \pm 0,1843$ $P < 0,0001$ IC de 95% ANOVA. Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; * diferença significativa ($P < 0,05$ no pós-teste de Dunnett de múltipla comparação) entre o grupo Ctrl e o grupo marcado com o mesmo sinal; • refere-se a valor atípico (outlier); Ctrl – controle; Ca cplx – carcinoma complexo; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca tbp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido; n = 25 amostras tumorais – São Paulo – 2014.....	157
--------------	---	-----

- Gráfico 36 - Representação gráfica do quociente da expressão dos tumores ($[\Delta Ct]$) para BRCA1 agrupados por grau histológico e em função da expressão do grupo controle. Média do grupo controle (Ctrl) $1,00 \pm 0,1843$ $P < 0,0001$ IC de 95% ANOVA. Na representação em boxplot de Tuckey, a caixa representa os percentis de 25 a 75%, a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os limites superior e inferior do intervalo de confiança; * refere diferença significativa no pós-teste de Dunnett de múltipla comparação entre o grupo Ctrl e o grupo marcado com o mesmo sinal; • refere-se a valor atípico (outlier). N = 25 amostras tumorais; Ctrl – controle; GI – grau 1; GII – grau 2; GIII – grau 3 – São Paulo – 2014..... 158
- Gráfico 37 - Curva de Kaplan-Meier de fração de sobrevivência em função da imunorreatividade do marcador tumoral BRCA2 considerando-se a data da mastectomia evento inicial e a morte por neoplasia mamária maligna evento final. Teste log-rank de Mantel-Cox: $P > 0,05$ $X^2 = 0,1964$ GL 1. n = 56 animais – São Paulo – 2014... 161
- Gráfico 38 - Representação gráfica do quociente da expressão dos tumores ($2\Delta Ct$ amostra) para BRCA2 agrupados por tipo histológico e em função da expressão do grupo controle ($2\Delta Ct$ controle). Média do grupo controle (Ctrl) $1,00 \pm 0,1843$ $P < 0,0001$ IC de 95% ANOVA. Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; * diferença significativa ($P < 0,05$ no pós-teste de Dunnett de múltipla comparação) entre o grupo Ctrl e o grupo marcado com o mesmo sinal; • refere-se a valor atípico (outlier); Ctrl – controle; Ca cplx – carcinoma complexo; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca tbp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido; n = 24 amostras tumorais – São Paulo – 2014..... 163
- Gráfico 39 - Representação gráfica do quociente da expressão dos tumores ($[\Delta Ct]$) para BRCA2 agrupados por grau histológico e em função da expressão do grupo controle. Média do grupo controle (Ctrl) $1,00 \pm 0,1843$ $P < 0,0001$ IC de 95% ANOVA. Na representação em boxplot de Tuckey, a caixa representa os percentis de 25 a 75%, a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os limites superior e inferior do intervalo de confiança; * refere diferença significativa no pós-teste de Dunnett de múltipla comparação entre o grupo Ctrl e o grupo marcado com o mesmo sinal; • refere-se a valor atípico (outlier). n = 24 amostras tumorais; Ctrl – controle; GI – grau 1; GII – grau 2; GIII – grau 3 – São Paulo – 2014..... 164

Gráfico 40 -	Representação gráfica da correlação entre os escores de BRCA2 obtidos por imunoistoquímica e da expressão deste marcador obtida por meio de PCR em tempo real. $r = -0,1298$ e $r^2 = 0,01684$ com $P = 0,5354$ e IC 95% - Coeficiente de Correlação de Pearson. N = 26 – São Paulo – 2014.....	165
Gráfico 41 -	Curva de Kaplan-Meier de fração de sobrevida em função da imunorreatividade do marcador tumoral ERR α considerando-se a data da mastectomia evento inicial e a morte por neoplasia mamária maligna evento final. Teste log-rank de Mantel-Cox: $P > 0,05$ $X^2 = 0,001812$ GL 1. n = 51 animais – São Paulo – 2014.....	169
Gráfico 42 – A B C D E F	Representação gráfica do quociente da expressão dos tumores ($2\Delta Ct$ alvo) para ERR α , ERR β e ERR γ agrupados por tipo histológico (A, C e E) e tipo histológico (B, D, F) em função da expressão do grupo controle ($2\Delta Ct$ ref). Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; * diferença significativa ($P < 0,05$ no pós-teste de Dunnett de múltipla comparação) entre o grupo Ctrl e o grupo marcado com o mesmo sinal; • refere-se a valor atípico (outlier); Ctrl – controle; Ca cplx – carcinoma complexo; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca tbp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido; GI – grau 1; GII – grau 2; GIII – grau 3 – São Paulo – 2014.....	172
Gráfico 43 -	Curva de Kaplan-Meier de fração de sobrevida em função da imunorreatividade do marcador tumoral FGFR2 considerando-se a data da mastectomia evento inicial e a morte por neoplasia mamária maligna evento final. Teste log-rank de Mantel-Cox: $P < 0,05$ $X^2 = 4,437$ GL 1. n = 56 animais – São Paulo – 2014.....	177
Gráfico 44 -	Curva de Kaplan-Meier de fração de sobrevida em função da imunorreatividade do marcador tumoral GATA3 considerando-se a data da mastectomia evento inicial e a morte por neoplasia mamária maligna evento final. Teste log-rank de Mantel-Cox: $P > 0,05$ $X^2 = 1,4909$ GL 1. n = 56 animais – São Paulo – 2014....	182

- Gráfico 45 - Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade de GATA3 em forma de variável contínua (porcentagem de células imunorreativas em relação ao total de células contadas pelo método HSCORE), agrupados em função do tipo histológico tumoral. Média do grupo controle (Ctrl) $128,3 \pm 37,69$ $P < 0,05$ IC de 95% ANOVA. Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; * diferença significativa ($P < 0,05$ no pós-teste de Dunnett de múltipla comparação) entre o grupo Ctrl e o grupo marcado com o mesmo sinal; Ctrl – controle; Ca cplx – carcinoma complexo; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca tbp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido; n = 78 amostras tumorais – São Paulo – 2014..... 183
- Gráfico 46 - Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade de GATA3 em forma de variável contínua (porcentagem de células imunorreativas em relação ao total de células contadas pelo método HSCORE), agrupados em função do grau histológico tumoral. Média do grupo controle (Ctrl) $130,4 \pm 42,2$ $P = 0,0102$ IC de 95% ANOVA. Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; * diferença significativa ($P < 0,05$ no pós-teste de Dunnett de múltipla comparação) entre o grupo Ctrl e o grupo marcado com o mesmo sinal. Ctrl – controle, GI, GII, GIII – grau histológico 1, 2 e 3; n = 78 amostras tumorais – São Paulo – 2014..... 185
- Gráfico 47 - Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade de GATA3 em forma de variável contínua (porcentagem de células imunorreativas em relação ao total de células contadas pelo método HSCORE) em função da pontuação dos tumores por ER α , $P < 0,05$ teste t de Student; ER α + - tumores positivos para receptor de estrógeno; ER α - tumores negativos para receptor de estrógeno; ER α - – São Paulo – 2014..... 186
- Gráfico 48 - Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade de GATA3 em forma de variável contínua (porcentagem de células imunorreativas em relação ao total de células contadas pelo método HSCORE) em função da pontuação dos tumores por FGFR2. $P < 0,05$ teste t de Student; FGFR2+ - tumores positivos para FGFR2; ER α - tumores negativos FGFR2 – São Paulo – 2014..... 187

- Gráfico 49 - Representação gráfica do quociente da expressão dos tumores ($2\Delta Ct$ alvo) para GATA3 agrupados por tipo histológico e em função da expressão do grupo controle ($2\Delta Ct$ controle). Média do grupo controle (Ctrl) $1,00 \pm 0,3323$ $P > 0,05$ IC de 95% ANOVA. Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; * diferença significativa ($P < 0,05$ no pós-teste de Dunnett de múltipla comparação) entre o grupo Ctrl e o grupo marcado com o mesmo sinal; • refere-se a valor atípico (outlier); Ctrl – controle; Ca cplx – carcinoma complexo; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca tbp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido; n = 27 amostras tumorais – São Paulo – 2014..... 189
- Gráfico 50 - Representação gráfica do quociente da expressão dos tumores ($[\Delta Ct]$) para BRCA1 agrupados por grau histológico e em função da expressão do grupo controle. Média do grupo controle (Ctrl) $1,00 \pm 0,1843$ $P < 0,0001$ IC de 95% ANOVA. Na representação em boxplot de Tuckey, a caixa representa os percentis de 25 a 75%, a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os limites superior e inferior do intervalo de confiança; * refere diferença significativa no pós-teste de Dunnett de múltipla comparação entre o grupo Ctrl e o grupo marcado com o mesmo sinal; • refere-se a valor atípico (outlier). N = 25 amostras tumorais; Ctrl – controle; GI – grau 1; GII – grau 2; GIII – grau 3 – São Paulo – 2014..... 189
- Gráfico 51 - Representação gráfica da correlação entre os escores de BRCA2 obtidos por imunoistoquímica e da expressão deste marcador obtida por meio de PCR em tempo real. $r = -0,07024$ e $r^2 = 0,00493$ com $P = 0,7331$ e IC 95% - Coeficiente de Correlação de Pearson. n = 26 – São Paulo – 2014..... 190

Capítulo 5

- Gráfico 52 - Representação gráfica dos escores de imunorreatividade de 5MeCyt em forma de histograma, com as amostra agrupadas segundo o tipo histológico da lesão. Os escores foram obtidos da soma de 3 x número de células com marcação nuclear forte com 2 x o número de células com marcação moderada e 1 x o número de células com marcação fraca; LENN – lesão epitelial não neoplásica; n = 109 amostras – São Paulo – 2014.....

Gráfico 53 -	Representação gráfica dos escores de imunorreatividade de 5MeCyt agrupados segundo o tipo histológico da lesão. Medianas iguais a 136,2 para LENN; 123,5 para tumores benignos e 115,0 para tumores malignos. Teste de Kruskal-Wallis $P > 0,05$ IC 95%. Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; LENN – lesão epitelial não neoplásica; n = 109 animais – São Paulo – 2014.....	220
Gráfico 54 -	Representação gráfica dos escores de imunorreatividade de 5MeCyt por amostra e agrupados segundo o tipo histológico da lesão tecidual. Teste de Kruskal-Wallis $P > 0,05$ para IC 95%. Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; n = 109 animais - São Paulo – 2014.....	221
Gráfico 55 -	Representação gráfica dos escores de imunorreatividade de 5MeCyt por amostra e agrupados segundo o grau histológico da lesão tecidual. de Kruskal-Wallis $P > 0,05$ para IC 95% Na representação em boxplot de Tuckey, a caixa representa os percentis de 25 a 75%, a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os limites superior e inferior do intervalo de confiança; Ctrl – grupo controle composto por LENNs – lesões epiteliais não neoplásicas; n = 74 amostras - São Paulo – 2014.....	222
Gráfico 56 -	Representação gráfica dos escores de imunorreatividade de 5MeCyt em função da ocorrência ou não de recidiva tumoral. Teste de Mann-Whitney $P < 0,05$ para IC 95%. Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; n = 102 animais. - São Paulo – 2014.....	225
Gráfico 57 -	Representação gráfica da distribuição dos animais em função do padrão de metilação obtido dos escores de imunorreatividade de 5MeCyt e em função malignidade do tumor. Teste de Qui-quadrado: $X^2 = 9,387$ $P < 0,01$ para IC 95% Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; n = 102 animais. - São Paulo – 2014.....	226

Gráfico 58 - Curva de Kaplan-Meier de fração de sobrevida em função do padrão de metilação dos tumores obtidos por meio categorização dos escores de imunorreatividade de 5MeCyt, considerando-se a data da mastectomia evento inicial e a morte por neoplasia mamária maligna evento final. Teste log-rank de Mantel-Cox: $X^2 = 5,182$; $P > 0,05$ GL 1; teste Logrank para tendência $X^2 = 4,856$ $P < 0,05$ GL 1. n = 61 animais. - São Paulo – 2014..... 227

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1 -	Distribuição das lesões mamárias neoplásicas em função do tipo e grau histológico – São Paulo – 2014.....	54
Tabela 2 -	Distribuição dos animais por raça e por acometimento ou não por doença mamária neoplásica – São Paulo – 2014.....	56
Tabela 3 -	Distribuição tumores mamários em função do grau de malignidade e diâmetro do observado no maior tumor – São Paulo – 2014.....	58
Tabela 4 -	Análise de riscos proporcionais de Cox em função das covariáveis diâmetro do tumor, grau histopatológico do tumor, uso de quimioterapia adjuvante ou neoadjuvante e recidiva ou nova apresentação do tumor - São Paulo – 2014.....	63

Capítulo 3

Tabela 5 -	Distribuição dos animais do experimento em função da raça – São Paulo – 2014.....	85
Tabela 6 -	Distribuição das lesões mamárias epiteliais por tipo e grau histopatológico – São Paulo – 2014.....	87
Tabela 7 -	Frequência dos escores segundo tipo histológico do tumor e reação do marcador ER α para teste do Qui-quadrado – São Paulo – 2014.....	95
Tabela 8 -	Frequência dos escores segundo grau histológico do tumor e reação do marcador ER α para teste do Qui-quadrado – São Paulo – 2014.....	97
Tabela 9 -	Frequência dos escores segundo tipo histológico do tumor e reação do marcador PR para teste do Qui-quadrado – São Paulo – 2014.....	105
Tabela 10 -	Frequência dos escores segundo grau histológico do tumor e reação do marcador PR para teste do Qui-quadrado – São Paulo – 2014.....	106
Tabela 11 -	Frequência dos escores segundo tipo histológico do tumor e reação do marcador Ki67 para teste do Qui-quadrado – São Paulo – 2014.....	113

Tabela 12 -	Frequência dos escores segundo grau histológico do tumor e reação do marcador Ki67 para teste do Qui-quadrado – São Paulo – 2014.....	114
Tabela 13 -	Frequência dos escores segundo tipo histológico do tumor e reação do marcador HER2 para teste do Qui-quadrado – São Paulo – 2014.....	118
Tabela 14 -	Frequência dos escores segundo grau histológico do tumor e reação do marcador HER2 para teste do Qui-quadrado – São Paulo – 2014.....	119
Tabela 15 -	Tabela de frequência dos tumores malignos por tipo histológico e subtipo molecular segundo classificação CMSa para teste do Qui-quadrado. n = 61 – São Paulo – 2014.....	121
Tabela 16 -	Tabela de frequência dos tumores malignos segundo tipo histológico e classificação molecular segundo classificação CMGs para teste do Qui-quadrado. N = 61 – São Paulo – 2014.	122
Tabela 17 -	Tabela de frequência dos tumores malignos por grau histológico e subtipo molecular segundo classificação CMSa para teste do Qui-quadrado. n = 61 – São Paulo – 2014.....	122
Tabela 18 -	Tabela de frequência dos tumores malignos segundo grau histológico e classificação molecular segundo classificação proposta por CMGs para teste do Qui-quadrado. n = 61 – São Paulo – 2014.....	123

Capítulo 4

Tabela 19 -	Frequência de ocorrência das raças dos animais utilizados nos estudos de qPCR – São Paulo – 2014.....	155
-------------	---	-----

Capítulo 5

Tabela 20 -	Distribuição dos animais do experimento por raça – São Paulo – 2014.....	212
Tabela 21 -	Distribuição das lesões epiteliais neoplásicas e não neoplásicas em função do tipo e grau histológico – São Paulo – 2014.....	216
Tabela 22 -	Frequência dos escores segundo grau de malignidade e padrão de metilação em função do índice obtido pelo tumor para o teste do Qui-quadrado – São Paulo – 2014.....	226

LISTA DE QUADROS

Capítulo 3

Quadro 1 -	CMSa - Modelo de classificação molecular de neoplasias mamárias caninas proposto por Sassi et al. (2010) – São Paulo – 2014.....	82
Quadro 2 -	CMGs - Modelo de classificação molecular de neoplasias mamárias humanas proposto no St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011 - Goldhirsch et al. (2011) – São Paulo – 2014.....	83
Quadro 3 -	Coeficiente de correlação de Pearson para ER α , PR e Ki67 – São Paulo – 2014.....	91
Quadro 4 -	Imunorreatividade de ER α como variável contínua vs tipo histológico tumoral – ANOVA – São Paulo – 2014.....	92
Quadro 5 -	Imunorreatividade de ER α como variável contínua vs grau histológico tumoral – ANOVA – São Paulo – 2014.....	96
Quadro 6 -	Imunorreatividade de PR como variável contínua vs tipo histológico tumoral – ANOVA – São Paulo – 2014.....	102
Quadro 7 -	Imunorreatividade de PR como variável contínua vs grau histológico tumoral – ANOVA – São Paulo – 2014.....	104
Quadro 8 -	Imunorreatividade de Ki67 como variável contínua vs tipo histológico tumoral – ANOVA – São Paulo – 2014.....	110
Quadro 9 -	Imunorreatividade de Ki67 como variável contínua vs grau histológico tumoral – ANOVA – São Paulo – 2014.....	111
Quadro 10 -	Análise de riscos proporcionais de Cox (método “enter”) para os subtipos moleculares segundo classificação proposta por Sassi et al (2010), n = 61 – São Paulo – 2014.....	121
Quadro 11 -	Análise de riscos proporcionais de Cox (método “forward”) para os subtipos moleculares segundo classificação CMSa – São Paulo – 2014.....	125
Quadro 12 -	Análise de riscos proporcionais de Cox (método “forward”) para os subtipos moleculares segundo classificação CMGs – São Paulo – 2014.....	125

Capítulo 4

Quadro 13 - Distribuição da razão da expressão de BRCA1 em função do grupo controle para diferentes tipos histológicos de tumor mamário. $P < 0,05$ ANOVA – São Paulo – 2014.....	156
Quadro 14 - Distribuição da razão da expressão de BRCA1 em função do grupo controle do grau histológico do tumor mamário. $P < 0,05$ ANOVA – São Paulo – 2014.....	157
Quadro 15 - Avaliação da imunorreatividade de BRCA2 em função do tipo e grau histológico e estadiamento clínico P = significância no teste do Qui-quadrado; n = total de amostras – São Paulo – 2014.....	158
Quadro 16 - Avaliação da imunorreatividade de BRCA2 em função do tipo e grau histológico e estadiamento clínico P = significância no teste Exato de Fisher; n = total de amostras – São Paulo – 2014.....	159
Quadro 17 - Avaliação da imunorreatividade de BRCA2 em função dos demais marcadores. P = significância no teste do Qui-quadrado; n = total de amostras – São Paulo – 2014.....	159
Quadro 18 - Avaliação da imunorreatividade de BRCA2 em função dos demais marcadores. P = significância no teste do Exato de Fischer; n = total de amostras – São Paulo – 2014.....	160
Quadro 19 - Distribuição da razão da expressão de BRCA2 em função do grupo controle para diferentes tipos histológicos de tumor mamário. $P > 0,05$ ANOVA – São Paulo – 2014.....	163
Quadro 20 - Distribuição da razão da expressão de BRCA2 em função do grupo controle para o grau histológico do tumor mamário. $P > 0,05$ ANOVA – São Paulo – 2014.....	164
Quadro 21 - Avaliação da imunorreatividade de $ERR\alpha$ em função do tipo e grau histológico e em função do estadiamento clínico. P = significância no teste do Qui-quadrado; n = total de amostras – São Paulo – 2014.....	167
Quadro 22 - avaliação da imunorreatividade de BRCA2 em dos demais marcadores e das classificações CMSa e CMGS. P = significância no teste do Exato de Fischer; n = total de amostras – São Paulo – 2014.....	168
Quadro 23 - Distribuição da razão da expressão de $ERR\alpha$, $ERR\beta$ e $ERR\gamma$ em função do grupo controle para diferentes tipos histológicos de tumor mamário. $P < 0,05$ ANOVA – São Paulo – 2014.....	170

Quadro 24 - Distribuição da razão da expressão de BRCA1 em função do grupo controle do grau histológico do tumor mamário. $P < 0,05$ ANOVA – São Paulo – 2014.....	171
Quadro 25 - Correlação de Pearson entre a expressão de R_{NAM} dos três $ERR\alpha$ obtida por qPCR e a expressão de $ERR\alpha$ por imunoistoquímica – São Paulo – 2014.....	173
Quadro 26 - Avaliação da imunorreatividade de FGFR2 em função do tipo e grau histológico e em função do estadiamento clínico. $P =$ significância no teste do Qui-quadrado; $n =$ total de amostras – São Paulo – 2014.....	175
Quadro 27 - Avaliação da imunorreatividade de FGFR2 em dos demais marcadores e das classificações CMSa e CMGS. $P =$ significância no teste do Exato de Fischer; $n =$ total de amostras – São Paulo – 2014.....	176
Quadro 28 - Análise de riscos proporcionais de Cox (método “enter”) para a expressão de FGFR2 tendo como covariáveis em forma categórica $ER\alpha$, PR, KI67, HER2 E BRCA2. $P = 0,0941$, $n = 56$ animais – São Paulo – 2014.....	177
Quadro 29 - Análise de riscos proporcionais de Cox (método “enter”) para a expressão de FGFR2 tendo como covariável em forma categórica grau histológico do tumor. $P = 0,0004$, $n = 56$ animais – São Paulo – 2014.....	178
Quadro 30 - Análise de riscos proporcionais de Cox (método “enter”) para a expressão de FGFR2 tendo como covariável em forma categórica grau histológico do tumor. $P = 0,0005$, $n = 56$ animais – São Paulo – 2014.....	178
Quadro 31 - Avaliação da imunorreatividade de GATA3 em função do tipo e grau histológico e em função do estadiamento clínico. $P =$ significância no teste do Qui-quadrado; $n =$ total de amostras – São Paulo – 2014.....	180
Quadro 32 - Avaliação da imunorreatividade de GATA3 em dos demais marcadores e das classificações CMSa e CMGS. $P =$ significância no teste do Exato de Fischer; $n =$ total de amostras – São Paulo – 2014.....	181
Quadro 33 - Avaliação da imunorreatividade de GATA3 em função do tipo histológico. ANOVA – São Paulo – 2014.....	183
Quadro 34 - Avaliação da imunorreatividade de GATA3 em função do grau histológico. ANOVA – São Paulo – 2014.....	184

Quadro 35 -	Análise de riscos proporcionais de Cox (método “enter”) para a expressão de GATA 3 e FGFR2 como covariáveis em forma categórica, n = 56 animais – São Paulo – 2014.....	187
Quadro 36 -	Distribuição da razão da expressão de GATA3 em função do grupo controle e tipo histológico do tumor mamário. $P > 0,05$ ANOVA – São Paulo – 2014.....	188
Quadro 37 -	Distribuição da razão da expressão de GATA3 em função do grupo controle e do grau histológico do tumor mamário. $P > 0,05$ ANOVA – São Paulo – 2014.....	188
 Capítulo 5		
Quadro 38 -	Composição dos grupos segundo tipo histológico tumoral para fins de análise estatística – São Paulo – 2014.....	212
Quadro 39 -	Distribuição das lesões epiteliais neoplásicas e não neoplásicas em função do tipo histológico da lesão tecidual – São Paulo – 2014.....	221
Quadro 40 -	Distribuição das lesões epiteliais neoplásicas e não neoplásicas em função do grau histológico da lesão tecidual – São Paulo – 2014.....	222
Quadro 41 -	Distribuição dos escores de imunorreatividade de 5MeCyt em função do estadiamento, tamanho do tumor e número de mitoses por campo de 400x. Teste de Kruskal-Wallis onde n = número de indivíduos por subgrupo, N = número total de indivíduos da amostra analisada e P = significância estatística – São Paulo – 2014.....	223
Quadro 42 -	Distribuição dos escores de imunorreatividade de 5MeCyt em função do estadiamento, tamanho do tumor e número de mitoses por campo de 400x. Teste de Kruskal-Wallis onde n = número de indivíduos por subgrupo, N = número total de indivíduos da amostra analisada e P = significância estatística – São Paulo – 2014.....	224
Quadro 43 -	Distribuição dos escores de imunorreatividade de 5MeCyt em função de recidiva tumoral. Teste de Mann-Whitney com $P = 0,0224$ para IC 95% – São Paulo – 2014.....	225
Quadro 44 -	Análise de riscos proporcionais de Cox (método “enter”) para o padrão de metilação obtido por meio da imunorreatividade de 5MeCyt em análise univariada, n = 56 animais – São Paulo – 2014.....	227

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO – NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS E BIOMARCADORES.....	42
2	ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DAS NEOPLASIAS MAMÁRIAS EM FÊMEAS CANINAS DE SANTOS - BRASIL	46
2.1	INTRODUÇÃO.....	47
2.2	REVISÃO DE LITERATURA.....	48
2.3	MATERIAL E MÉTODO.....	51
2.4	RESULTADOS.....	53
2.5	DISCUSSÃO.....	65
2.6	CONCLUSÃO.....	68
	REFERÊNCIAS.....	69
3	CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DAS NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS POR MEIO DE ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO E O VALOR PROGNÓSTICO DE SEUS SUBTIPOS.....	72
3.1	INTRODUÇÃO.....	72
3.2	REVISÃO DE LITERATURA.....	73
3.3	MATERIAL E MÉTODO.....	76
3.3.1	Animais.....	76
3.3.2	Amostras de tecido tumoral.....	77
3.3.3	Exame histopatológico e gradação tumoral.....	77
3.3.4	Marcação imunoistoquímica.....	78
3.3.5	Aquisição de imagem e contagem da marcação imunoistoquímica.....	79
3.3.6	Obtenção dos escores e índices de marcação tumoral.....	80
3.3.7	Classificação molecular dos tumores.....	81
3.3.8	Avaliação da sobrevida.....	82

3.3.9	Análise estatística.....	83
3.4	RESULTADOS.....	84
3.5	DISCUSSÃO.....	125
3.6	CONCLUSÃO.....	133
	REFERÊNCIAS.....	135
4	ESTUDO DOS BIOMARCADORES BRCA1, BRCA2, ERR ALFA, BETA E GAMA, FGFR2 E GATA-3 EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS ESPONTÂNEAS DE CÃES: BUSCA POR CANDIDATOS A MARCADORES TUMORAIS.....	143
4.1	INTRODUÇÃO.....	143
4.2	REVISÃO DE LITERATURA.....	144
4.3	MATERIAL E MÉTODO.....	147
4.3.1	Animais.....	147
4.3.2	Amostras de tecido tumoral.....	147
4.3.3	Exame histopatológico e gradação tumoral.....	148
4.3.4	Marcação imunoistoquímica.....	148
4.3.5	Aquisição de imagem e contagem da marcação imunoistoquímica.....	149
4.3.6	Obtenção dos escores e índices de marcação tumoral.....	149
4.3.7	Estudo de expressão gênica.....	150
4.3.8	Quantificação dos resultados da expressão dos genes em estudo por meio do PCR.....	152
4.3.9	Avaliação da sobrevida.....	153
4.3.10	Análise estatística.....	153
4.4	RESULTADOS.....	154
4.5	DISCUSSÃO.....	190
4.6	CONCLUSÃO.....	198
	REFERÊNCIAS.....	198

5	ESTUDO DO PADRÃO DE METILAÇÃO GLOBAL DO DNA EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS.....	204
5.1	INTRODUÇÃO.....	204
5.2	REVISÃO DE LITERATURA.....	205
5.3	MATERIAL E MÉTODO.....	207
5.3.1	Animais.....	207
5.3.2	Amostras de tecido tumoral.....	208
5.3.3	Exame histopatológico e gradação tumoral.....	209
5.3.4	Marcação imunoistoquímica.....	209
5.3.5	Aquisição de imagem e contagem da marcação imunoistoquímica.....	210
5.3.6	Obtenção dos escores e índices de marcação tumoral.....	211
5.3.7	Avaliação da sobrevida.....	213
5.3.8	Análise estatística.....	212
5.4	RESULTADOS.....	214
5.5	DISCUSSÃO.....	228
5.6	CONCLUSÃO.....	230
	REFERÊNCIAS.....	232
6	CONCLUSÕES GERAIS.....	234
	REFERÊNCIAS.....	235

Capítulo 1

Introdução: Neoplasias mamárias caninas e biomarcadores

1 INTRODUÇÃO – NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS E BIOMARCADORES

Nas últimas décadas, considerável investimento foi feito na detecção precoce do câncer. O aumento do número de casos de cânceres assintomáticos ou ainda em estágios pré-malignos pode ser atribuído aos programas de triagem mais eficientes e na mudança de práticas clínicas. O diagnóstico definitivo do câncer, no entanto, ainda se baseia no estudo histopatológico dos tumores (CHATTERJEE; ZETTER, 2005).

As neoplasias mamárias, como a maioria dos cânceres, são consideradas doenças genéticas em que mutações nas células somáticas ou nas linhagens germinativas estão envolvidas tanto na iniciação quanto na promoção e progressão.

O maior desafio para a compreensão da doença repousa, contudo, em sua complexidade, na medida em que as neoplasias se comportam como um conjunto de sistemas orgânicos determinados por aberrações gênicas, interações intercelulares, características individuais da paciente e influências ambientais.

Assim, ganham especial importância os estudos que propiciem a compreensão das alterações moleculares determinadas pelas modificações no genoma das células normais e que lhe conferem o fenótipo neoplásico. Estas alterações do material genético, que tanto podem envolver modificações diretas na sequência de bases do DNA, caracterizando as mutações como nos mecanismos epigenéticos de controle gênico, caracterizando as alterações epigenéticas, propiciam a formação de moléculas ou antígenos, os biomarcadores, produzidos pelo organismo ou pelo próprio tumor e que são passíveis de serem detectados por meio de técnicas como imunoistoquímica e PCR em tempo real, entre outras.

O uso mais comum dos biomarcadores está no diagnóstico precoce da doença, na detecção precoce de recidivas, na previsão da evolução clínica, bem como na seleção de terapias individualizadas, como por exemplo, a utilização de herceptina, um anticorpo monoclonal, em pacientes HER2 positivos (CHATTERJEE; ZETTER, 2005; HARRIS et al., 2007).

Também em Medicina Veterinária a busca por novos biomarcadores se justifica, na medida em que a participação dos cães na vida dos seres humanos têm se tornado marcante devido a urbanização das cidades e os desafios da vida moderna, tornando os cães verdadeiros membros das famílias. Esta proximidade, no

entanto, expõe esta espécie aos mesmos problemas e riscos a que são submetidos os seres humanos, como o contato com pesticidas e defensivos agrícolas, poluição ambiental e aos desreguladores endócrinos (PAOLONI; KHANNA, 2007; ANDRADE et al., 2010).

Tendo em vista o crescente interesse nos animais como sentinelas em relação ao câncer e no estudo das neoplasias mamárias caninas em busca de modelos translacionais, este trabalho buscou avaliar por meio da técnica de imunoistoquímica, a expressão de biomarcadores consagrados como de receptor de estrógeno alfa, receptor de progesterona, do proto-oncogene HER2 e do marcador de proliferação celular Ki67, na expectativa do estabelecimento de classificação em subtipos moleculares que possa melhor explicar o comportamento biológico heterogêneo observado em tumores comumente agrupados no mesmo tipo histológico.

Também o estudo de marcadores ainda incipientes em Medicina Veterinária, como os supressores de tumor BRCA1 e BRCA2, a busca por candidatos a novos marcadores como GATA3 e FGFR2, cuja utilização no diagnóstico das neoplasias mamárias é inédito em Medicina Veterinária, foram objetos deste estudo por meio da técnica de imunoistoquímica e de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real, ou simplesmente qPCR. Neste estudo, buscou-se a correlação destes candidatos a marcadores ao tipo e grau histológico tumoral, à comparação de seu comportamento com biomarcadores conhecidos e sua capacidade prognóstica de sobrevida.

Finalmente, interessava conhecer o padrão de metilação global das neoplasias mamárias caninas, uma vez que as alterações do epigenoma são apontadas como uma das capacidades adquiridas que permitiriam à célula normal adquirir fenótipo neoplásico e que independem das alterações que afetam diretamente a sequência de bases do DNA. Assim, procedeu-se ao estudo imunoistoquímico da 5 metilcitosina, uma citosina metilada presente em regiões ricas deste nucleotídeo e que tem a importante função de permitir ou reprimir a expressão dos genes aos quais pertencem. Também este biomarcador foi confrontado com características clínicas dos tumores como estadiamento clínico, diagnóstico histopatológico e sua capacidade preditiva de evolução clínica da doença.

Restava saber, no entanto, se a população estudada, pertencente à região Metropolitana de Santos, sede do maior porto brasileiro e incriminado pelos índices elevados de poluentes ambientais presentes no solo e nos mananciais de água

desta região (ZAGO et al., 2005) apresentava comportamento diferenciado em relação à doença e a outras regiões brasileiras, o que a colocaria em destaque para estudos translacionais. Com este propósito, procedeu-se a estudo clínico-epidemiológico das fêmeas caninas atendidas pelo Hospital Veterinário da Universidade Metropolitana de Santos.

Este trabalho teve, portanto, o objetivo geral de estudar algumas das alterações genéticas e epigenéticas presentes nas neoplasias mamárias de fêmeas caninas, correlacionando o comportamento de marcadores tumorais associados a estas alterações e seu valor prognóstico de sobrevida. Para cumprir com estes objetivos realizamos quatro estudos organizados em capítulos, os quais serão apresentados a seguir.

Capítulo 2

Estudo epidemiológico das neoplasias mamárias em fêmeas caninas de Santos – Brasil

2 ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DAS NEOPLASIAS MAMÁRIAS EM FÊMEAS CANINAS DE SANTOS - BRASIL

2.1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama constitui-se num importante problema de saúde pública por ser a neoplasia maligna de maior incidência na população feminina e a primeira causa de mortalidade por neoplasia entre mulheres brasileiras.

Também nas fêmeas caninas as neoplasias mamárias constituem-se em neoplasia das mais freqüentes e um problema importante em Medicina Veterinária.

Por estas razões, os tumores mamários caninos de ocorrência espontânea têm sido considerados como modelos para o estudo do câncer de mama na espécie humana em função de suas similaridades morfológicas, anatômicas e fisiológicas e em função dos cães dividirem o mesmo ambiente com seus proprietários, expondo-se, assim, aos mesmos fatores ambientais de risco, tendo como ponto de convergência para ambas as espécies, a exposição prolongada a estrogênios endógenos ou exógenos como fator de risco comum.

Desta forma, por compartilhar com seus donos um ambiente comum, os cães poderiam se prestar como sentinelas desta doença, no entanto, várias diferenças entre as duas espécies devem ser levadas em conta para que as comparações sejam válidas, pois, enquanto a proliferação mioepitelial é um achado comum no padrão tumoral complexo e misto na espécie canina, estes padrões são considerados eventos incomuns na espécie humana justificando, assim, pesquisas que apontem com segurança as semelhanças e as diferenças do comportamento desta doença entre estas duas espécies.

Este estudo teve a finalidade de avaliar as características epidemiológicas das neoplasias mamárias em cães habitantes da Região Metropolitana da Baixada Santista e estudar indicadores clínicos como diagnóstico histopatológico, tamanho do tumor, estadiamento clínico, evolução clínica e resposta terapêutica como fatores prognósticos.

2.2 REVISÃO DE LITERATURA

Os tumores de glândula mamária são as neoplasias que mais comumente acometem as fêmeas caninas e representam um grupo altamente heterogêneo em termos de morfologia e comportamento biológico (NERURKAR, 1989; GAMA; ALVES; SCHIMITT, 2008). Cerca da metade dos tumores mamários caninos são considerados malignos e a identificação de fatores prognósticos confiáveis é essencial na quantificação de riscos individuais de desencadeamento clínico desfavorável (DAGLI, 2008; GAMA; ALVES; SCHIMITT, 2008; CASSALI et al., 2011).

O conhecimento de diversos fatores de risco está bem estabelecido na doença neoplásica mamária nos cães, em especial a idade da paciente, dieta, predisposição genética ligada a algumas raças e influência hormonal, particularmente nos animais não castrados. As glândulas mamárias são, na verdade, glândulas sudoríparas modificadas formadas por parênquima (alvéolos) e estroma (tecido conjuntivo), vasos e nervos. Nas fêmeas caninas, as neoplasias mamárias se desenvolvem na chamada “linha do leite”, formada por duas cadeias de glândulas mamárias paralelas à linha abdominal média, em geral em número de cinco pares. (SORENMO, 2003; SLEECKX et al., 2011).

Cadelas com neoplasia mamária são em geral animais mais velhos, com idade média entre 9 e 11 anos, não castradas ou castradas tardiamente por ocasião do diagnóstico. Muitos destes animais apresentam-se clinicamente bem quando levados ao médico veterinário para avaliação de seus tumores e não raro, a doença neoplásica mamária é um achado incidental em exames clínicos de rotina (SORENMO, 2003; CASSALI et al., 2011; SLEECKX et al., 2011).

A duração das manifestações clínicas varia de poucos dias a vários meses e em geral, animais com curtos períodos de manifestações clínicas costumam apresentar tumores mais agressivos e com pior evolução clínica (SORENMO, 2003).

Na maioria das vezes, os tumores mamários caninos se apresentam na forma de nódulo único ou múltiplos, circunscritos e de tamanho, consistência e mobilidade variados, podendo ou não estar aderidos à pele e aos tecidos profundos. Os nódulos também podem se apresentar ulcerados e com reação inflamatória local. As glândulas caudais abdominais e inguinais são, em geral, mais comumente afetadas

que as glândulas torácicas (SORENMO, 2003; CASSALI et al., 2011; SLEECKX et al., 2011).

Quando a doença metastática está presente, os animais podem apresentar manifestações clínicas inespecíficas como cansaço, letargia, perda de peso, dispnéia, tosse, linfedema e claudicação. A extensão e a localização das metástases determinam a ocorrência e a severidade das manifestações clínicas. Embora os carcinomas utilizem preferencialmente a via linfática para metastizar aos linfonodos regionais e pulmões, também pode ocorrer disseminação pela via hematógena (SLEECKX et al., 2011).

Durante o exame físico específico, ambas as cadeias devem ser examinadas e um perfil completo da paciente deve ser obtido, incluindo-se exames laboratoriais complementares como hemograma, perfil bioquímico, eletro e ecocardiograma, radiografias torácicas em três posições e exame ultrassonográfico abdominal para pesquisa de metástase à distância. A biópsia excisional deve ser considerada como procedimento de rotina para o diagnóstico histopatológico do tumor, gradação tumoral e avaliação do comprometimento das margens cirúrgicas. Os linfonodos sentinelas são os primeiros linfonodos a receber a drenagem linfática da neoplasia e possuem alto risco de acometimento por metástase regional. Por esta razão, indica-se a biópsia excisional ou aspirativa por agulha fina destes linfonodos, padrão ouro em Medicina no controle da doença neoplásica mamária na mulher. Com base no perfil completo da paciente, é possível estabelecer seu estadiamento clínico, classificação com comprovado valor prognóstico (YAMAGAMI et al., 1996; CASSALI et al., 2011; SLEECKX et al., 2011).

Os tumores mamários são comumente classificados histologicamente com base na sua histogênese, recebendo nomes de acordo com os tecidos que os originam, sendo defendido por diversos autores o valor prognóstico destas classificações. Ao exame histopatológico, os nódulos mamários caninos podem se apresentar desde lesões epiteliais não neoplásicas, como hiperplasias e ectasias, a lesões de diferentes graus de malignidade, numa gama que abrange dos tumores benignos aos tumores malignos mais agressivos e anaplásicos. As neoplasias de origem epitelial são as mais comumente vistas na glândula mamária canina, porém, não são raras as apresentações mistas, em que o componente mioepitelial também está envolvido, podendo haver a presença de áreas de osso e cartilagem ou mesmo

formações neoplásicas de origem puramente mesenquimais (MISDORP et al. 1999; SORENMO, 2003; CASSALI et al., 2011, SLEECKX et al., 2011).

Os tumores epiteliais são comumente classificados de acordo com seu padrão histológico e grau de diferenciação, com maior frequência diagnóstica na cadela para os carcinomas simples tubulares ou adenocarcinomas (BENJAMIN; LEE; SAUNDERS, 1999; SORENMO, 2003).

A cirurgia mantém-se ainda como a melhor opção terapêutica para a maioria dos tumores mamários caninos, à exceção das neoplasias inoperáveis altamente metastáticas e para a maioria dos carcinomas inflamatórios, entidade clínica caracterizada por evolução fulminante de aparecimento súbito nas glândulas mamárias, que apresentam edema, eritema, calor e rigidez, com ou sem a presença de um nódulo detectável. Histologicamente pode ter origem em vários tipos de carcinomas de alto grau de malignidade, tendo como característica histológica marcante a invasão dos vasos linfáticos da derme por êmbolos neoplásicos. Além da cirurgia, vários protocolos de tratamento quimioterápico e a utilização de antagonistas da progesterona (antiprogestinas) são sugeridos pelos autores (CASSALI et al., 2011; GOLDSCHMIDT; PEÑA; RASOTO, 2011; SLEECKX et al., 2011).

Vários estudos apontam para fatores que teriam valor prognóstico nos tumores de mama, tais como tamanho do tumor, tipo histológico, gradação histopatológica e acometimento dos linfonodos (PEREZ ALENZA et al., 2000; KARAYANNOPOULOU et al., 2005; YAMAGAMI et al., 1996; GAMA; ALVES; SCHIMITT, 2008). Por outro lado, com o seqüenciamento genético de quase a totalidade do genoma canino (99%) e a clara evidência de sua estreita relação com o genoma humano (KHANNA et al., 2006; DAGLI, 2008; UVA et al., 2009), os tumores mamários caninos de ocorrência espontânea têm sido considerados modelos para o estudo do câncer de mama na espécie humana, por suas características histomorfológicas, similaridade anatômica e fisiológica com a espécie humana e pelo fato dos cânceres se desenvolverem naturalmente em cães dentro do ambiente que eles dividem com seus proprietários, sofrendo influência dos mesmos fatores que afetam a iniciação e progressão tumoral em humanos como idade, sexo, fatores nutricionais, estado reprodutivo e exposição ao ambiente. (KHANNA et al., 2006; PORRELLO; CARDELLI; SPUGNINI, 2006; PAOLONI; KHANNA, 2007).

O desenvolvimento dos tumores na cadela tem caráter hormônio-dependente, como apontam os estudos que sugerem o efeito protetor da castração precoce, antes do primeiro cio (SORENMO et al., 2000; PORRELLO; CARDELLI; SPUGNINI, 2008). O padrão de decréscimo dos receptores de estrógenos movendo-se do tecido normal ao carcinoma agressivo aponta para a perda progressiva da dependência hormonal durante a tumorigênese. Por estas razões, as neoplasias mamárias na cadela representam modelo apropriado para o estudo do câncer de mama não-hormônio dependente na mulher, devido ao seu comportamento previsível de malignidade e padrão metastático (PORRELLO; CARDELLI; SPUGNINI, 2006).

Por outro lado, o câncer de mama, que por séculos é apontado pelos clínicos como o tumor clássico das mulheres é ainda hoje um problema que afeta mulheres do mundo todo, causando preocupação por sua característica epidêmica que as afeta, mas também pelo seu potencial de marcador patológico de exposição hormonal aos desreguladores endócrinos, partículas presentes no ambiente e que têm impacto sobre a espécie humana e aos animais (SASCO, 2001).

2.3 MATERIAL E MÉTODO

Para contextualização da doença neoplásica mamária na população canina da Região Metropolitana da Baixada Santista, foram revisados retrospectivamente os prontuários médicos de 14.298 cães atendidos entre os anos de 2005 e 2010 no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Metropolitana de Santos – UNIMES – São Paulo – Brasil, em busca de diagnóstico clínico de neoplasia mamária, em estudo que compreendeu 72 meses de prospecção.

Ainda buscando a contextualização desta população, foi realizado estudo de geoprocessamento mediante localização geográfica do domicílio dos animais deste trabalho, por meio da inserção dos endereços dos imóveis, obtidos do cadastro de clientes do Hospital Veterinário da UNIMES, no sítio eletrônico <http://www.findlatitudeandlongitude.com/batch-geocode/>. Os mapas de referência foram obtidos por meio do sítio do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE e referem-se ao Censo de 2010. A construção do mapa temático foi realizado

por meio do programa TerraView 4.2.2, com a adaptação de *datums* e cálculo da distância dos domicílios até o Hospital Veterinário da UNIMES por meio do programa R version 3.0.2 (The R Foundation for Statistical Computing, 2013).

Neste estudo foram incluídos cães do sexo feminino com diagnóstico histopatológico de neoplasia mamária epitelial, que receberam ou não tratamento anterior para a mesma doença e que tenham ou não sido submetidos a tratamento quimioterápico adjuvante ou neoadjuvante. Foram excluídos os registros de animais que não tiveram seu diagnóstico confirmado por exame histopatológico e os animais que apresentaram neoplasias não epiteliais, ainda que localizadas em região de glândulas mamárias.

Dos prontuários médicos foram obtidas informações quanto ao sexo, raça, peso, idade ao diagnóstico, histórico de castração anterior à doença, exames complementares como hemograma, perfil hepático e renal, eletrocardiograma, ecocardiograma e exame ultrassonográfico abdominal, quando aplicáveis, e estudo radiográfico de tórax em três posições (ventro-dorsal e latero-laterais direita e esquerda) para pesquisa de metástase e estadiamento clínico da doença. O estadiamento estabelecido à época dos atendimentos médicos foi baseado no relato de Yamagami et al. (1996). Por se tratar de material de arquivo, a classificação histopatológica predominante dos tumores foi baseada em Misdorp et al. (1999) enquanto a gradação tumoral baseou-se no método de Elston Elis modificado, conforme Karayannopoulou et al. (2005).

Também foram obtidas informações quanto ao tipo de tratamento instituído, diagnóstico histopatológico do tumor e gradação tumoral.

A pesquisa do tempo de livre da doença e sobrevida foi realizada por meio de contato telefônico com os proprietários dos animais, realizada em julho de 2012, permitindo um segmento mínimo de 18 meses após a mastectomia, período equivalente a 5 anos de acompanhamento em seres humanos, conforme sugerido por Lebeau¹ (1953 apud DAGLI, 2008, p. 229).

Foi considerado óbito por doença neoplásica mamária apenas naqueles animais com evidências inequívocas como morte por eutanásia após recidiva ou nova apresentação do tumor ou por doença metastática pulmonar diagnosticada ao

¹ LEBEAU, A. L'age du chien et celui de l'homme. Essai de statistique sur la mortalité canine. **Bulletin de l'Academie Veterinaire de France**, v. 26, p. 229-232, 1953.

exame radiográfico ou por doença metastática ganglionar levando a edema de membro ou claudicação.

Dos animais não sacrificados, apenas para aqueles que morreram em função de caquexia neoplásica decorrente do tumor mamário foi considerado como óbito por doença neoplásica mamária.

As análises estatísticas foram realizadas com o programas Prism 5 *for* Windows® v. 5.0 (GraphPad Prism®) – ANOVA, Kaplan-Meier e construção dos gráficos e MedCalc v. 12.7.7 *for* Windows® (MedCalc software bvba) para pesquisa de valores atípicos (*outliers*) e testes do Qui-quadrado de Pearson, correlação de Pearson, correlação de Spearman e modelo de riscos proporcionais de Cox.

Considerou-se estatisticamente significativo $P < 0,05$ para um intervalo de confiança de 95% (IC 95%). Foram tratados como censurados nas análises de sobrevida os animais que ainda se encontravam vivos ao final deste estudo, os animais que apresentaram óbito por outra doença ou outros tumores e aqueles dos quais não foi possível obter informação devido impossibilidade de contato com seus proprietários, seja pela mudança de número telefônico ou pela mudança de endereço.

2.4 RESULTADOS

Com o propósito de apresentar a população em estudo, a figura 1 demonstra a localização da região estudada em relação ao Estado de São Paulo e a distribuição dos casos de neoplasia mamária canina atendidos pelo Hospital Veterinário da UNIMES durante o período de 2015 a 2010. Por falha nos registros cadastrais, 9 animais não puderam ter a localização de seu domicílio plotada no mapa da figura 1.

Figura 1 - Distribuição geoespacial dos domicílios dos animais atendidos pelo Hospital Veterinário da UNIMES, com diagnóstico de neoplasia mamária, durante o período de aquisição de 2005 a 2010; n = 161 animais – São Paulo – 2014

Fonte: BIONDI, L.R., 2014

Dos quatorze mil duzentos e noventa e oito (14.298) prontuários médicos revisados, 7882 animais eram do sexo masculino e 6416 de sexo feminino. Desta população, 672 animais de ambos os sexos apresentaram diagnóstico clínico de neoplasia em diferentes sistemas, correspondendo a 4,7% dos animais atendidos até então. No entanto, apenas 505 animais tiveram tratamento cirúrgico conduzido neste hospital veterinário e seus tumores avaliados por exame histopatológico.

Entre as fêmeas, 317 delas receberam diagnóstico histopatológico de neoplasia, entre os quais foi possível identificar 170 laudos de tumores mamários epiteliais, equivalente a 53,6% dos diagnósticos de neoplasias entre os animais de sexo feminino.

Histologicamente, os tumores foram divididos em 18 diagnósticos de tumores benignos (11 adenomas simples, 6 adenomas complexos e um mioepitelioma) e 152 malignos (64 carcinomas de arranjo simples tubular, 49 carcinomas complexos, 16

carcinomas mistos, 12 carcinomas sólidos, 9 carcinomas de arranjo simples túbulo-papilífero e 2 carcinomas ductais *in situ*). Destes animais, dois apresentavam diagnóstico clínico de carcinoma inflamatório, contudo, sem confirmação ao exame histopatológico. A tabela 1 apresenta a distribuição dos laudos histopatológicos por frequência, bem como a distribuição dos tumores por grau histológico, cuja maior frequência ocorreu nos tumores de grau I.

Tabela 1 - Distribuição das lesões mamárias neoplásicas em função do tipo e grau histológico – São Paulo – 2014

Lesão	Tipo	Quantidade e Frequência (%)	Grau		
			I	II	III
Benigna	Adenoma	11 (6,5%)			
	Adenoma complexo	6 (3,5%)			
	Mioepitelioma	1 (0,6%)			
	Subtotal	18 (10,6%)			
Maligna	Carcinoma simples tubular	64 (37,6%)	54 (35,5%)	9 (5,9%)	1 (0,7%)
	Carcinoma complexo	49 (28,6%)	40(26,3%)	8(5,3%)	1 (0,7%)
	Carcinoma misto	16 (9,4%)	15 (9,9%)	1 (0,7%)	
	Carcinoma sólido	12 (7,1%)		1 (0,7%)	11 (7,2%)
	Carcinoma túbulo-papilífero	9 (5,3%)	7 (4,6%)	2 (1,3%)	
	Carcinoma ductal <i>in situ</i>	2 (1,2%)			
	Subtotal	152 (89,4%)	116 (76,3%)	21 (13,8%)	13 (8,6%)
Total		170 (100%)			

Com esta distribuição, foi possível o estudo de sobrevida baseado no tipo e grau histológico, onde foi observada diferença estatisticamente significativa no teste de log-rank (Mantel-Cox) para a sobrevida em função do grau histológico, com $X^2 = 27,30$ GL = 2 e $P < 0,0001$ para IC 95% e $P < 0,0001$ também para tendência. No entanto, não foi observada diferença significativa entre os grupos quando a sobrevida foi avaliada em função do tipo histológico do tumor com $X^2 = 5,952$ GL = 2 e $P = 0,3109$ para IC 95%. Os gráficos 1 e 2 resumizam a probabilidade de sobrevida em função do grau e tipo histológico tumoral respectivamente. Para fins estatísticos, os carcinomas simples tubulares e túbulo-papilífero foram considerados um único grupo, nomeado “Ca simples”.

Gráfico 1 - Curva de Kaplan-Meier de probabilidade de sobrevida após mastectomia em função do grau histológico tumoral como fator prognóstico. Teste log-rank (Mantel-Cox) - $P < 0,0001$; $X^2 = 22,30$ GL = 2. Carcinoma ductal *in situ* não foi incluído; n = 150 animais - São Paulo – 2014

Gráfico 2 - Curva de Kaplan-Meier de probabilidade de sobrevida após mastectomia em função do tipo histológico tumoral como fator prognóstico. Teste log-rank (Mantel-Cox) - $P = 0,3109$; $X^2 = 5.952$ GL = 3. Carcinoma ductal *in situ* não foi incluído; n = 150 animais - São Paulo – 2014

Animais de diversas raças compuseram esta avaliação, com maior prevalência da doença mamária em animais de raça pura como cocker spaniel

inglês, boxer e pastores alemães. A tabela 2 apresenta a distribuição das raças das fêmeas que compõe a população atendida no Hospital veterinário da UNIMES, distribuídas por raça e por ocorrência ou não da doença mamária neoplásica, onde é possível observar que a ocorrência de neoplasia mamária nos animais sem raça definida é menor que a esperada para a população, diferentemente do observado para algumas raças puras, confirmada pelo teste do Qui-quadrado, com $X^2 = 57,12$ GL = 9 e $P < 0,0001$.

Tabela 2 - Distribuição dos animais por raça e por acometimento ou não por doença mamária neoplásica – São Paulo – 2014

Raça	Câncer de mama		Total
	Não afetado	Afetado*	
Cocker spaniel inglês	269	19 (6,6%)	288
Boxer	144	9 (5,9%)	153
Pastor alemão	266	14 (5,0%)	280
Poodle	940	41 (4,2%)	981
Pinscher	279	9 (3,1%)	288
labrador	123	4 (3,1%)	127
Teckel	287	7 (2,4%)	294
Srd	2329	47 (2,0%)	2376
rottweiler	287	4 (1,4%)	291
outras raças	1322	16 (1,2%)	1333
Total	6246	170	6416

* valores entre parênteses referem-se à ocorrência da raça do animal afetado relativa ao grupo racial ao qual pertence

srd – animais sem raça definida

No entanto, não houve diferença significativa na análise de sobrevida quando os animais foram agrupados por porte, categorizados em miniatura, pequeno, médio e grande porte, com $P > 0,05$; $X^2 = 6,650$ GL = 1 de teste de log-rank.

Em relação ao estado reprodutivo dos animais, vinte e sete animais possuíam histórico de castração anterior ao diagnóstico (15,7% da população estudada), com média de idade de $7 \pm 3,42$ anos por ocasião da cirurgia de esterilização. Apenas um relato de castração entre o primeiro e segundo cio foi observado entre os registros, sendo que os demais relatos apresentavam idades diversas à castração, em sua maioria motivada por doença endometrial cística. A análise de sobrevida em relação à idade à castração também não demonstrou diferença estatística entre as faixas etárias de 6 meses até 1 ano, com mais de 1 e menos de 5 anos e mais de 5 anos vida ($P > 0,05$ no teste de log-rank). Cinco dos prontuários avaliados relatavam

uso de contraceptivo entre os animais estudados, porém, o pequeno número desta ocorrência não permitiu análise estatisticamente confiável desta variável.

À avaliação clínica, os animais se apresentaram com idade média ao diagnóstico de $9,3 \pm 2,32$ anos, com os limites inferiores e superiores respectivamente em 2,4 e 9,3 anos e moda igual a 10 anos. A análise de sobrevida em relação à idade ao diagnóstico mostrou diferença estatística significativa entre as faixas etárias de 1 a 6; 6,1 a 12 e mais de 12 anos, com $X^2 = 7,778$ e $P = 0,0205$ no teste de log-rank, conforme gráfico 3.

Gráfico 3 - Curva de Kaplan-Meier de probabilidade de sobrevida após mastectomia em função da idade ao diagnóstico como fator prognóstico. Teste log-rank (Mantel-Cox) - $P < 0,05$; $X^2 = 7,778$ GL = 2; n = 152 animais - São Paulo – 2014

Em relação à apresentação tumoral, cem animais possuíam apresentação múltipla dos tumores mamários, 22 deles apresentavam tumores ulcerados (um adenoma e 21 carcinomas) e 16 aderidos à musculatura (todos eles carcinomas).

Para efeito de cálculo estatístico, considerou-se o diâmetro do maior tumor, quando em apresentação múltipla, conforme proposto por Sorenmo et al. (2011). A média de tamanho tumoral assim obtida foi igual a $4,76 \pm 3,86$ cm, com os limites inferior e superior respectivamente em 1,0 e 25 cm. A análise estatística da sobrevida dos animais com apresentação múltipla do tumor não demonstrou diferença significativa no teste de log-rank, assim como não houve diferença

estatística significativa no teste do Qui-quadrado entre o diâmetro do tumor e o grau de malignidade por ele apresentado. A tabela 3 demonstra a distribuição dos tumores por tamanho e malignidade, com os animais agrupados em função do diâmetro tumoral: até 3 cm de diâmetro, com mais de 3 e até 5 cm de diâmetro e com mais de 5 cm de diâmetro e em função do grau de malignidade dos tumores.

Tabela 3 - Distribuição tumores mamários em função do grau de malignidade e diâmetro observado no maior tumor – São Paulo – 2014

Diâmetro (cm)	Benigno		Maligno		Total
	N	%	n	%	
< 3	8	44,4	67	44,8	77
3 a < 5	6	33,3	38	24,7	44
> 5	4	22,2	47	30,5	51
Total	18	100,0	152	100,0	170

As figuras 2A, 2B, 2C e 2D demonstram diferentes situações da mesma doença, com diâmetros tumorais variados, apresentação de carcinoma inflamatório e metástase cutânea de neoplasia mamária confirmada por biópsia aspirativa com agulha fina e citologia.

No entanto, a análise de sobrevida em função do diâmetro do maior tumor apresentou diferença estatística significativa entre os grupos, quando os animais foram separados em tumores maiores e menores de 5 cm de diâmetro, conforme curva de Kaplan-Meier apresentada no gráfico 4, com $P = 0,0004$ e $X^2 = 12,5$ GL = 1.

Gráfico 4 - Curva de Kaplan-Meier de probabilidade de sobrevida após mastectomia em função do diâmetro máximo do tumor como fator prognóstico. Teste log-rank (Mantel-Cox) – $P < 0,05$; $X^2 = 12,5$ GL = 1; n = 152 - São Paulo – 2014

Figura 2 - Imagens 2A e 2B - fêmeas portadoras de nódulos mamários de diferentes tamanhos. Imagem 2C - animal com diagnóstico clínico e histopatológico de carcinoma inflamatório. Imagem 2D - animal com metástase cutânea de neoplasia mamária, diagnosticada com exame citológico por biópsia aspirativa com agulha fina. Fonte: imagens 2A, 2B E 2C – arquivo pessoal de Paola Monte Alegre Américo; Imagem 2D - Luiz Roberto Biondi – São Paulo – 2014

Fonte: BIONDI, L.R., 2014

Três animais apresentavam metástase cutânea de neoplasia mamária, confirmada por citologia ou exame histopatológico, enquanto apenas dois animais apresentavam metástase pulmonar diagnosticável ao exame radiográfico de tórax por ocasião do diagnóstico e três animais apresentavam linfonodos positivos clínica e citologicamente confirmados por ocasião primeiro atendimento. Tendo em vista o reduzido número de animais com diagnóstico de metástase pulmonar ou de comprometimento nodal, estas variáveis foram analisadas estatisticamente em função de seu peso no estadiamento clínico baseado no método de TNM.

Também a sobrevida, quando avaliada em função do estadiamento clínico apresentou diferença estatística significativa nos modelos de Kaplan-Meier e teste de log-rank com $P = 0,0078$; $\chi^2 = 9,700$ GL = 2, demonstrados no gráfico 5.

Gráfico 5 - Curva de Kaplan-Meier de probabilidade de sobrevida após mastectomia em função do estadiamento clínico baseado no método da Organização Mundial de saúde - WHO TNM como fator prognóstico (n=152). Teste log-rank (Mantel-Cox) - $P < 0,05$; $\chi^2 = 9,700$ GL = 2; Devido ao número não significativo de animais com estágio 2, este grupo foi incorporado ao estágio 1 para efeito de análise estatística; n = 152 animais - São Paulo – 2014

Cinquenta e dois dos animais atendidos foram submetidos à mastectomia total e 120 foram submetidos à mastectomia parcial. Dos animais submetidos a tratamento cirúrgico, 93 foram submetidos à ovariectomia simultaneamente. A análise estatística de sobrevida tanto do tipo de mastectomia – parcial ou total – e mastectomia prévia não indicaram diferença significativa no teste de log-rank ($P = 0,7238$; $\chi^2 = 0,1169$ GL = 1 e $P = 0,2537$, $\chi^2 = 0,2758$ GL = 1 respectivamente). A figura 3A, 3B E 3C apresentam um animal da espécie canina com doença neoplásica mamária avançada, com diversos nódulos ulcerados e o resultado final da mastectomia associada à cirurgia de reconstrução (anaplastia) da área em que os tumores foram removidos.

Figura 3 - Imagens de fêmea canina (3A) portadora de doença mamária neoplásica, composta por diversos tumores ulcerados e hemorrágicos (3b) e sua resolução cirúrgica no pós-operatório imediato (3C). Fotomontagem realizada por sua autora, Paola Monte Alegre Américo – São Paulo – 2014

Fonte: AMERICO, P.M.A., 2014

Dos animais tratados cirurgicamente, dezessete animais foram submetidos à quimioterapia adjuvante ou neoadjuvante, com diferença estatística significativa no teste de log-rank, com $P = 0,0104$; $X^2 = 6,650$ GL = 1, conforme gráfico 6.

Gráfico 6 - Curva de Kaplan-Meier de probabilidade de sobrevida após mastectomia em função de quimioterapia adjuvante ou neoadjuvante como fator prognóstico. Teste log-rank (Mantel-Cox) - $P < 0,05$; $X^2 = 6,650$ GL = 1; n = 152 animais - São Paulo – 2014

Contrariamente ao esperado, nota-se menor sobrevida nos animais que necessitaram de tratamento quimioterápico anterior ou posterior à mastectomia.

Nos relatos do acompanhamento clínico, seis animais apresentaram recidiva após mastectomia total enquanto 17 animais apresentaram tumor mamário nas mamas remanescentes após mastectomia parcial, representando respectivamente 3,48 e 9,88% dos animais em estudo, conforme gráfico 7, cujos valores obtidos na análise de sobrevida foram de $P < 0,0001$; $X^2 = 40,26$ GL = 1 indicando diferença estatística significativa entre os grupos

Gráfico 7 - Curva de Kaplan-Meier de probabilidade de sobrevida após mastectomia em função da recidiva ou nova apresentação do tumor como fator prognóstico. Teste log-rank (Mantel-Cox) - $P < 0,0001$; $X^2 = 40,26$ GL = 1; n = 152 animais - São Paulo – 2014

As variáveis clínicas que apresentaram significância estatística no modelo de Kaplan-Meier foram submetidas à análise multivariada de Cox, utilizando-se do modelo de risco proporcional em busca de influência mútua entre estas covariáveis. Foram selecionados para compor o modelo o diâmetro do tumor e o grau histopatológico do tumor, o uso de quimioterapia e recidiva, conforme relacionadas na tabela 4. Embora com valor prognóstico, o estadiamento não foi incluído no modelo, pois, simulações matemáticas entre as covariáveis demonstraram que o estadiamento clínico perde independência e valor prognóstico na análise de regressão de Cox.

As covariáveis selecionadas demonstraram diferença estatística altamente significativa com $P < 0,0001$ no modelo de ajuste global. Em relação à análise de

risco, os animais com tumores maiores que 5 cm de diâmetro apresentaram 72,1% maior probabilidade de morte por doença neoplásica mamária que os animais com tumores menores (b - beta positivo). O mesmo foi observado em relação a grau do tumor, com 75,5% e 90,1% de probabilidade de morte, respectivamente, para os graus II e III, bem como à quimioterapia neoadjuvante e recorrência, com probabilidade de 73,2 e 91,8% de morte em comparação ao grupo controle (sem tratamento/não recorrência), em todas as situações acima citadas, apresentando significância estatística ($P < 0,05$ e 95% do intervalo de confiança maior que 1,0).

Tabela 4 - Análise de riscos proporcionais de Cox em função das covariáveis diâmetro do tumor, grau histopatológico do tumor, uso de quimioterapia adjuvante ou neoadjuvante e recidiva ou nova apresentação do tumor São Paulo – 2014

Covariável	b	EP	P	Exp(b)	95% CI of Exp(b)
Diâmetro do maior tumor < 3cm	0,3884	0,5714	0,4967	1,4746	0,4839 to 4,4939
Diâmetro do maior tumor > 5cm	0,9497	0,4685	0,0426	2,5848	1,0368 to 6,4442
Grau II	1,1272	0,4884	0,0210	3,0869	1,1911 to 8,0000
Grau III	2,2119	0,6740	0,0010	9,1326	2,4537 to 33,9909
Quimioterapia = sim	1,0026	0,4768	0,0355	2,7253	1,0756 to 6,9049
Recidiva = sim	2,4147	0,4539	<0,0001	11,1864	4,6167 to 27,1049

b = coeficiente de regressão beta

EP – erro padrão

Exp(b) = exponencial de beta

Ao término do levantamento telefônico, quarenta e dois animais ainda estavam vivos e 82 haviam morrido ao final do estudo, sendo 35 dos óbitos atribuídos à doença neoplásica mamária, 9 atribuídos a outros tumores desenvolvidos após a mastectomia (lipossarcoma, hemangiossarcoma, carcinoma epidermóide, fibrossarcoma, e osteossarcoma) e 38 atribuídos a outras doenças como insuficiência cardíaca congestiva e insuficiência renal e ao envelhecimento natural. No entanto, os proprietários de 46 animais não puderam ser localizados devido à mudança de endereço e número telefônico ou por incorreção no registro de dados.

2.5 DISCUSSÃO

Estudos epidemiológicos de câncer em Medicina Veterinária são ferramentas muito importantes para compreender melhor o comportamento desta doença em uma determinada população e permitir a definição de novas estratégias para o controle do câncer. Ganham importância, também, pelo fato dos tumores caninos poderem ser usados como modelos translacionais importantes, uma vez que os cães compartilham o mesmo ambiente dos seres humanos e são propensos aos mesmos fatores de risco. Tumores mamários são muito prevalentes em cães, assim como em seres humanos, e os mesmos fatores endógenos e exógenos estão, possivelmente, envolvidos na sua etiologia (DAGLI, 2006; KHANNA et al., 2006; PAOLONI; KHANNA, 2007; UVA et al., 2009; PINHO et al., 2012). Por outro lado, não é raro que os patologistas sejam questionados pelos clínicos sobre o grau de malignidade e prognóstico dos diferentes tipos histológicos das neoplasias mamárias caninas sob sua responsabilidade diagnóstica.

A prevalência de câncer de mama na população deste estudo (89,4%) está de acordo com relatos anteriores, que descrevem o câncer de mama como uma doença altamente prevalente em cães, com ocorrência entre 26 a 73% na população canina, na dependência da região estudada (PEREZ Alenza et al., 2000; MUNSON; MORESCO, 2007; ANDRADE et al., 2010; OLIVEIRA FILHO et al., 2011), o que pode ser atribuído à idade em que os animais foram esterilizados (média de idade da cirurgia $7 \pm 3,42$ anos, com intervalo de meio a 14 anos).

Embora os achados deste estudo sobre o tipo histológico do tumor e sobrevida esteja em desacordo com alguns relatos (PEREZ ALENZA et al., 2000; GOLDSCHMIDT et al., 2011; SLEECKX et al., 2011), a distribuição gráfica para das curvas de cada tipo histológico e a menor sobrevida associada particularmente ao grau III, que demonstrou pior evolução clínica, está de acordo com estudos anteriores e conforme observado clinicamente (PEREZ ALENZA et al., 2000; KARAYANNOPOULUS; KALDRYMIDOU; CONSTANTINIDIS, 2005; GOLDSCHMIDT et al., 2011; SORENMO; RASOTO; ZAPPULLI, 2011).

A idade ao diagnóstico ($9,3 \pm 2,3$ anos) e a diferença estatística entre os grupos na análise de sobrevida corroboram os relatos publicados, que associaram menor sobrevida em cadelas de meia-idade e idosas (PEREZ ALENZA et al., 2000;

CHANG et al., 2005; SLEECKX et al., 2011; SORENMO; RASOTO; ZAPPULLI, 2011).

Os resultados relativos à associação da raça e câncer da glândula mamária estão de acordo com estudos atuais, como discutido por Sorenmo et al. (2011), que relataram que tumores mamários podem ocorrer em cadelas de qualquer raça, sendo que as raças relatadas em diferentes trabalhos podem variar dependendo de onde esses estudos se originam, como apontado por este trabalho, no qual se observou maior risco para algumas raças puras. No entanto, a distribuição dos animais por tamanho para avaliar a taxa de sobrevivência não denotou significância estatística nem tendência à mesma, ao contrário de Itoh (2005), que encontrou maior sobrevida entre os animais de raças pequenas; provavelmente, esta divergência também foi motivada em razão das diferenças entre as populações estudadas.

Conforme descrito, os achados deste estudo em relação ao diâmetro do tumor foram significativamente associados com o prognóstico, embora a apresentação de tumores múltiplos não tenha evidenciado diferença significativa, em desacordo com estudos anteriores (SORENMO; RASOTO; ZAPPULLI, 2011).

A análise de sobrevida relacionada ao estadiamento clínico mostrou diferença estatística significativa entre os estágios, o que está de acordo com a literatura (YAMAGAMI et al., 1996; CHANG et al., 2005; KARAYANNOPOULUS; KALDRYMIDOU; CONSTANTINIDIS, 2005; CASSALI et al., 2011; SLEECKX et al., 2011), apontando o comprometimento nodal e a presença de metástase à distância como fatores que influenciam fortemente a evolução clínica menos favorável e apontando esta variável como uma ferramenta importante, de baixo custo e facilmente disponível para os clínicos.

Uma questão importante que preocupa os clínicos é o valor da ovariectomia simultânea à realização da mastectomia. A análise estatística deste estudo indicou que não houve diferença significativa na taxa de sobrevida entre os animais que foram submetidos à ovariectomia simultânea daqueles não submetidos à cirurgia, nem entre as fêmeas submetidas a mastectomia parcial ou submetidas à mastectomia total; tais achados apresentam-se em concordância com Cassali et al. (2011) para os quais a melhor escolha para o tratamento cirúrgico do câncer de mama em cães (excisão radical ou parcial) ainda é controversa. Em um estudo no qual foram avaliadas 99 cadelas submetidas à mastectomia parcial,

58% dos animais mostraram novas neoplasias nas glândulas mamárias ipsilaterais, sugerindo cautela na decisão de manter as glândulas mamárias intactas nesses animais (STRATMANN et al., 2008). Os resultados do presente estudo corroboram o estudo acima citado, uma vez que os animais com recorrência ou apresentação de novos tumores mostraram um pior prognóstico.

Em relação à quimioterapia adjuvante, este estudo apresenta um dado interessante, uma vez que os animais não tratados apresentaram sobrevida maior quando comparados aos animais submetidos à quimioterapia adjuvante. Esta constatação aparentemente contraditória pode ser atribuída ao estado clínico pré-operatório desfavorável destes animais, ou ainda, a ocorrência de tipos tumorais mais agressivos para os quais a conduta terapêutica impõe o tratamento quimioterápico. De fato, Cassali et al. (2011) destacaram as limitações nas informações sobre os benefícios atuais da quimioterapia adjuvante no tratamento do câncer de mama em cadelas e a necessidade de estudos mais aprofundados sobre o tema.

As mortes relacionadas à doenças não neoplásicas, bem como o número de mortes por outras doenças estão de acordo com relatos na literatura (BENJAMIN; LEE; SAUNDERS, 1999; STRATMANN et al., 2008). Na verdade, o câncer é considerado uma doença crônica em seres humanos e estudos realizados na última década apontam para diferenças importantes em sua incidência e mortalidade, especialmente em pacientes com câncer de mama, onde apesar do aumento no relato da doença, os regimes terapêuticos têm aumentado a sobrevida das pacientes. Possivelmente, com a evolução da Medicina Veterinária experimentada nos últimos anos, esta realidade também esteja acontecendo com os cães (ALBERT; BENJAMIN; SHUKLA, 1994).

Os resultados do presente trabalho apresentaram algumas divergências com resultados dos outros estudos; no entanto, a dificuldade de se comparar estudos de sobrevivência e prognóstico deve ser considerada, uma vez que existem diferenças nos parâmetros utilizados como evento final nos estudos de sobrevida (morte, recidiva da doença) e nos tempos de segmento utilizados. Em geral, os diversos estudos descritos realizaram acompanhamento de 18 a 24 meses, enquanto o presente trabalho contou com acompanhamento de 90 meses, considerando-se os animais que primeiramente adentraram no estudo, o que poderia explicar a diferença observada em relação à literatura atual.

2.6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que o estadiamento clínico das neoplasias mamárias caninas é um fator prognóstico importante e de baixo custo e deve ser utilizado como rotina na abordagem do paciente com câncer de mama canino. Além disso, a análise multivariada com modelo de risco proporcional de Cox demonstrou que as covariáveis diâmetro do tumor, grau do tumor, quimioterapia adjuvante e recorrência têm grande valor preditivo em relação à probabilidade de morte.

A alta prevalência de tumores mamários malignos nas fêmeas estudadas, particularmente do carcinoma simples tubular, qualifica a população canina da região Metropolitana de Santos como um modelo promissor para estudos translacionais de câncer de mama.

REFERÊNCIAS

- ALBERT, R. E.; BENJAMIN, S. A.; SHUKLA, R. Life span and cancer mortality in the Beagle dog and humans. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 74, p. 149-159, 1994.
- ANDRADE, F. H. E.; FIGUEIROA, F. C.; BERSANO, P. R. O.; BISSACOT, D. Z.; ROCHA, N. S. Malignant mammary tumor in female dogs: environmental contaminants. **Diagnostic Pathology**, v. 5, n. 45, 2010; doi:10.1186/1746-1596-5-45. Disponível em: <[http:// www.diagnosticpathology.org/content/5/1/45](http://www.diagnosticpathology.org/content/5/1/45) > Acesso em: jan. 2014.
- BENJAMIN, S. A.; LEE, A. C.; SAUNDERS, W. J. Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in Beagles. **Veterinary Pathology**, v. 36, p. 423–436, 1999.
- CASSALI, G. D.; LAVALLE, G. E.; DE NARDI, A. B.; FERREIRA, E.; BERTAGNOLLI, A. C.; ESTRELA-LIMA, A.; ALESSI, A. C.; DALECK, C. R.; SALGADO, B. S.; FERNANDES, C. G.; SOBRAL, R. A.; AMORIM, R. L.; GAMBA, C. O.; DAMASCENO, K. A.; AULER, P. A.; MAGALHÃES, G. M.; SILVA, J. O.; RAPOSO, J. B.; FERREIRA, A. M. R.; OLIVEIRA, L. O.; MALM, C.; ZUCCARI, D. A. P. C.; TANAKA, N. M.; RIBEIRO, L. R.; CAMPOS, L. C.; SOUZA, C. M.; LEITE, J. S.; SOARES, L. M. C.; CAVALCANTI, M. F.; FONTELES, Z. G. C.; SCHUCH, I. D.; PANIAGO, J.; OLIVEIRA, T. S.; TERRA, E. M.; CASTANHEIRA, T. L. L.; FELIX, A. O. C.; CARVALHO, G. D.; GUIM, T. N.; GUIM, T. N.; GARRIDO, E.; FERNANDES, S. C.; MAIA, F. C. L.; DAGLI, M. L. Z.; ROCHA, N. S.; FUKUMASU, H.; GRANDI, F.; MACHADO, J. P.; SILVA, S. M. M. S.; BEZERRE, J. E.; FREHSE, M. S.; PAES DE ALMEIDA, E. C.; CAMPUS, C. B. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 4, p. 153-180, 2011.
- CHANG, S. C.; CHANG, C. C.; CHANG, T. J.; WONG, M. L. Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumours, p. 79 cases (1998-2002). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 227, p. 1625-1629, 2005.
- DAGLI, M. L. Z. The search for suitable prognostic markers for canine mammary gland tumors: A promising outlook. **Veterinary Journal**, v. 177, p. 3-5, 2008.
- GAMA, A.; ALVES, A.; SCHIMITT, F. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. **Virchows Archiv**, v. 453, p. 123-132, 2008.
- GOLDSCHMIDT, M.; PEÑA, R.; RASOTTO, R.; ZAPULLI, V. Classification and Grading of Canine Mammary Gland Tumors. **Veterinary Pathology**, v. 48, p. 117, 2011. Disponível em: <<http://vet.sagepub.com/content/48/1/117>> Acesso em: nov. 2013.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2010 Disponível em: <[http, p.//www.ibge.gov.br/censo2010/](http://www.ibge.gov.br/censo2010/)> Acessado em: 18 nov. 2013.

ITOH, T.; UCHIDA, K.; ISHIKAWA, K.; KUSHIMA, K.; KUSHIMA, E.; TAMADA, H.; MORITAKE, T.; NAKAO, H.; SHII, H. Clinicopathological survey of 101 canine mammary gland tumors: differences between small-breed dogs and others. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 67, p. 345-347, 2005.

KARAYANNOPOULUS, M.; KALDRYMIDOU, E.; CONSTANTINIDIS, T. C.; DESSIRIS, A. Histological grading and prognosis in dogs with mammary gland carcinomas: application of a human grading method. **Journal of Comparative Pathology**, v. 133, p. 246-252, 2005.

KHANNA, C.; LINDBLAD-TOH, K.; VAIL, D.; LONDON, C.; BERGMAN, P.; BARBER, L.; BREEN, M.; KITCHELL, B.; MCNEIL, E.; MODIANO, J. F.; NIEMI, S.; COMSTOCK, K. E.; OSTRANDER, E.; WESTMORELAND, S.; WITHROW, S.; The dog as a cancer model. **Nature Biotechnology**, v. 24, p. 1065-1066, 2006.

MISDORP, W.; ELSE, R. W.; HELLMÉN, E.; LIPSCOMB, T. P. Book review: histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. **Armed Forces Institute of Pathology**, v. 58, p. 16-25, 1999.

MUNSON, L.; MORESCO, A. Comparative pathology of mammary gland cancers in domestic and wild animals. **Breast disease**, v. 28, p. 7-21, 2007.

NERURKAR, V. R.; CHITALE, A. R.; JALNAPURKAR, B. V.; NAIK, S. N.; LALITHA, V. S. Comparative pathology of canine mammary tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 101, p. 389-397, 1989.

OLIVEIRA FILHO, J. C.; KOMMERS, G. D.; MASUDA, E. K.; MARQUES, B. M. F. P. P.; FIGHERA, R. A.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C. S. L. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 177-185, 2010. Disponível em: <www.scielo.br/pdf/pvb/v30n2/v30n2a14.pdf>. Acesso em: 27 nov. 2013.

PAOLONI, M. C.; KHANNA, C. Comparative oncology today. **Veterinary Clinics of North America: small animal practice**, v. 37, p. 1023-1032, 2007.

PEREZ ALENZA, M. D.; PEÑA, L.; DEL CASTILLO, N.; NIETO, A. I. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. **Journal of Small Animal Practice**, v. 41, p. 287-291, 2000.

PINHO, S. S.; CARVALHO, S.; CABRAL, J.; GÄRTNER, F. Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis. **Translational Research**, v. 159, p. 165-172, 2012.

PORRELLO, A.; CARDELLI, P.; SPUGNINI, E. P. Oncology of companion animals as a model for humans: an overview of tumor histotypes. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 25, p. 97-106, 2006.

SASCO, A. J. Epidemiology of breast cancer: an environmental disease? **APMIS**, v. 109, p. 321-332, 2001.

SLEECKX, H. R.; KROEZE, E. J. B. V.; GINNEKEN, C. V.; BRANTEGEN, L. V. Canine mammary tumours, an overview. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 1112-1131, 2011.

SORENMO, K. Canine mammary gland tumours. **Veterinary Clinics of North America: small animal practice**, v. 33, p. 573-596, 2003.

SORENMO, K. U.; SHOFER, F. S.; GOLDSCHMIDT, M. H. Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, p. 266-270, 2000.

SORENMO, K. U.; RASOTO, R.; ZAPPULLI, V.; GOLDSCHMIDT, M. H. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. **Veterinary Pathology**, v. 48, p. 85-97, 2011.

STRATMANN, N.; FAILING, K.; RICHTER, A.; WEHREND, A. Mammary tumor recurrence in bitches after regional mastectomy. **Veterinary Surgery**, v. 37, n. 1, 82-86, 2008.

UVA, P.; AURISICCHIO, L.; WATTERS, J.; LOBODA, A.; KULKARNI, A.; CASTLE, J.; PALOMBO, F.; VITI, V.; MESITI, G.; ZAPPULLI, V.; MARCONATO, L.; ABRAMO, F.; CILIBERTO, G.; LAHM, A.; LA MONICA, N.; DE RINALDIS, E. Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. **BMC Genomics**, v. 10, p. 1-20, 2009.

YAMAGAMI, T.; KOBAYASHI, T.; TAKAHASHI, K.; SUGIYAMA, M. Prognosis for canine malignant mammary tumours based TNM and histologic classification. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 58, p. 1079-1083, 1996.

Capítulo 3

Classificação molecular das neoplasias mamárias caninas por meio de estudo imunoistoquímico e o valor prognóstico de seus subtipos

3 CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DAS NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS POR MEIO DE ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO E O VALOR PROGNÓSTICO DE SEUS SUBTIPOS

3.1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama canino é uma doença heterogênea, com variados aspectos morfológicos, moleculares, comportamentais e de resposta à terapia.

O manejo clínico desta doença na rotina atual depende da utilização de fatores clínicos e patológicos com caráter prognóstico e preditivo, tais como tamanho do tumor ao diagnóstico, tipo histológico e gradação tumoral para apoiar, assim, a tomada de decisão quanto à melhor abordagem clínica e terapêutica. Um fator prognóstico bem estabelecido para os tumores mamários caninos é a gradação histopatológica tumoral, que permite a avaliação morfológica de características biológicas do tumor e tem demonstrado ser capaz de gerar informações importantes relacionadas ao comportamento clínico dos cânceres de mama, embora esta relação nem sempre corresponda à resposta clínica da paciente.

O estudo imunoistoquímico tem desvendado várias características biológicas das neoplasias mamárias caninas, algumas delas associadas ao grau histológico, melhorando significativamente nossa compreensão da doença e se apresentando como ferramenta útil na identificação de tipos moleculares distintos e na determinação do prognóstico.

Assim, a classificação molecular das neoplasias mamárias caninas pode representar um incremento importante no manejo desta doença na prática clínica.

Por outro lado, esta espécie emerge como interessante modelo de estudo sobre o câncer, em especial o câncer de mama, tendo em vista sua ocorrência natural e de alta prevalência na cadela e à semelhança da mulher, sujeita a influências hormonais e às mesmas pressões ambientais, por conta da proximidade que esta espécie guarda com o homem.

Este trabalho teve por objetivo, portanto, a avaliação imunoistoquímica dos marcadores tumorais de receptor de estrógeno alfa (ER α), receptor de progesterona (PR), do oncogene HER2*neu* e do marcador de proliferação Ki67 e sua relação com

tipo histológico, grau histopatológico, agrupamento com base molecular e estudo da sobrevida de fêmeas portadoras de neoplasia mamária maligna.

3.2 REVISÃO DE LITERATURA

A marcação imunoistoquímica dos receptores de estrógeno alfa (ER α), dos receptores de progesterona (PR), do protooncogene HER2*neu* e do marcador de proliferação Ki67 é objeto de estudos isolados em Medicina Veterinária, tanto na tentativa de relacionar estes marcadores com características morfológicas dos tumores quanto por seu valor prognóstico.

Os receptores hormonais são proteínas que se ligam aos hormônios circulantes mediando seus efeitos celulares. O receptor de estrógeno foi identificado nos anos 1960 e estudos subseqüentes evidenciaram sua importância na carcinogênese. Em seres humanos, o estudo da expressão dos receptores de estrógenos nos tumores mamários tem importância no manejo clínico, tanto como indicador de resposta endócrina como fator prognóstico de recorrência precoce. Tumores com marcação positiva para receptor de estrógeno (ER+), em geral, são bem diferenciados, demonstram outras características de baixa agressividade e estão associados à maior sobrevida das pacientes. O receptor de progesterona é um gene regulado pelo hormônio estrógeno e, portanto, sua expressão é indicativa de funcionamento adequando da via do receptor de estrogênio. Tumores com marcação positiva para receptor de progesterona (PR+) em geral, apresentam melhor prognóstico e são indicativos de hormonioterapia. (RAKHA; REIS-FILHO; ELLIS, 2010).

Nas cadelas, estes receptores compõem uma família de fatores de transcrição expressos durante o ciclo estral, regulados por hormônios esteróides. Na puberdade, o estrógeno assume importante papel na proliferação do sistema de ductos das glândulas mamárias enquanto a progesterona assume importante papel no desenvolvimento dos alvéolos (TONITI et al., 2009).

Cerca de sessenta por cento dos tumores malignos na cadela possuem receptor de estrógeno e mais de 30% deles possuem receptores de progesterona, indicando sua dependência hormonal. Embora os estudos de Toniti et al. (2009) não

tenham relacionado a expressão dos receptores de estrógeno e de progesterona ao tipo tumoral, há indícios que a maior expressão destes receptores esteja associada ao melhor prognóstico, tanto nas fêmeas caninas como na mulher portadora de carcinoma mamário (TODOROVA, 2006; HORTA et al., 2012).

O proto-oncogene *HER2neu* ou receptor-2 do fator de crescimento epidérmico humano, também denominado HER2, c-erbB-2 e ERB B2, é um dos membros da subclasse 1 dos receptores de tirosina cinase (EISEMBERG; KOIFMAN, 2001). Sabe-se que na mulher, HER2 está amplificado ou superexpresso em aproximadamente 20 a 25% dos carcinomas mamários invasivos e sua expressão aumentada em pacientes humanos está associada com mau prognóstico e baixo período livre de doença, doença metastática progressiva e resposta pobre à quimioterapia. (ESTEVA et al., 2005; DARB-ESFAHANI et al., 2009; VAZQUEZ-MARTIN; OLIVERAS-FERRAROS; MENENDEZ, 2009).

Estudos anteriores demonstraram que tanto a amplificação de c-erbB-2 quanto a superexpressão da oncoproteína HER2 estão presentes nos tumores mamários caninos e que esta antecede a instalação de doença metastática (RUNGSIPIPAT et al., 1999; DUTRA et al., 2004).

O biomarcador Ki67 é uma proteína nuclear não histona que se encontra presente em todas as fases do ciclo celular exceto G₀, caracterizando-a como marcador de proliferação celular. Sua expressão nas neoplasias mamárias aumenta progressivamente num contínuo, da neoplasia mamária benigna ao câncer de mama invasivo. Em mulheres, seu valor prognóstico independe da idade, comprometimento ganglionar ou estado hormonal e está inversamente relacionado à expressão de receptores de estrógeno (CORONATO et al., 2002; SANTISTEBAN et al., 2009).

Em cães, a imunorreatividade de Ki67 foi relacionada ao tipo histológico tumoral, ao grau histológico e à sobrevida das pacientes. Estudo imunoistoquímico dos marcadores HER2 e Ki67 em adenocarcinomas mamários demonstrou forte correlação positiva entre estes marcadores (NOWAK; MADEJ; DZIEGEL, 2005; ZUCCARI et al., 2008; BADOWSKA-KOZAKIEWICZ, 2012).

No entanto, cresce o interesse pela classificação molecular dos tumores mamários, considerada uma valiosa ferramenta na avaliação prognóstica e na investigação de semelhanças entre os tumores mamários caninos e humanos (RIBEIRO et al., 2012).

De acordo com esta classificação, pelo menos cinco subtipos moleculares de carcinomas podem ser identificados baseados em sua expressão gênica: dois tipos “receptor-hormonal” (estrógeno e/ou progesterona) positivos: **luminal A** e **luminal B** e três tipos “receptor hormonal negativos”: **HER2**, **tipo basal** (por vezes também denominado triplo negativo ou ductal) e **carcinoma normal** (ou não basal). Sabe-se que, na mulher, os subtipos luminal A, luminal B, HER2 e tipo basal ou triplo negativo seguem esta ordem de grau de agressividade e pior prognóstico (SASSI et al., 2010; RIBEIRO et al., 2012; FERGUSON et al., 2013).

Para este último subtipo, no entanto, alguns autores relatam que a diferenciação entre os tipos basal, triplo negativo e carcinoma “normal” requer também a marcação imunoistoquímica das ceratinas basais CK 5/6 e CK 14 (GAMA; ALVES; SCHMITT, 2008; SASSI et al., 2010; KIM et al., 2012). No entanto, o *St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011* (GOLDHIRSCH et al., 2011) considerou a marcação por citoceratinas basais de baixa reprodutibilidade e insuficiente na identificação dos tumores tipo “basal” verdadeiros. Em Medicina Veterinária, Kim et al. (2012) também relataram a dificuldade de se classificar os tumores ER α , PR e HER2 negativos em tumores basais, triplo negativos ou carcinomas normais baseando-se nas ceratinas basais e no receptor do fator de crescimento epidérmico – EGFR.

Contudo, a tentativa de subclassificação dos carcinomas mamários caninos com estudo imunoistoquímico envolvendo receptores de estrógeno e progesterona, HER2 neu e citoceratinas, à semelhança da classificação dos tumores utilizada na espécie humana (luminal A, luminal B e basal), não conseguiu correlacionar o subtipo molecular ao grau histológico, sugerindo cautela na utilização de cães como modelo de estudo de neoplasias mamárias para a espécie humana (SASSI et al., 2010).

Recentemente foi proposta em Medicina a inclusão da marcação imunoistoquímica de Ki67 na diferenciação dos tumores luminais, particularmente os tipos luminal A e B. Assim, com base nas recomendações do *St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011* criou-se uma nova classificação dos subtipos moleculares dos tumores mamários na mulher, considerando-se o grupo *luminal A* os tumores ER e/ou PR positivos, HER2 negativos e Índice de Proliferação de Ki67(Ki67IP) menor que 14% (ER+, PR+, HER2-; ER+, PR-, HER2-; ER-, PR+, HER2-); *luminal B/HER2 negativo* os tumores

ER e/ou PR positivos, HER2 negativos e Ki67IP maior que 14% (ER+, PR+, HER2-; ER+, PR-, HER2-; ER-, PR+, HER2-); *luminal B/HER2 positivo* os tumores ER e/ou PR positivos, HER2 positivos e qualquer Ki67IP (ER+, PR+, HER2+; ER+, PR-, HER2+; ER-, PR+, HER2+); *HER2 positivo/não luminal* os tumores ER-, PR-, HER2+ e qualquer Ki67IP e finalmente o grupo *triplo negativo (ductal) ou basal*, composto por tumores ER-, PR-, HER2- e qualquer Ki67IP (GOLDHIRSCH et al., 2011).

Não há, até o momento, relatos da utilização da classificação proposta por Goldhirsch et al. (2011) para as neoplasias mamárias caninas.

3.3 MATERIAL E MÉTODO

3.3.1 Animais

Foram incluídos neste estudo prospectivo durante o período de aquisição de 2010 a 2012, 70 animais da espécie canina, de sexo feminino, de diferentes idades e raças, oriundas do serviço de atendimento ambulatorial do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Metropolitana de Santos – UNIMES (HOVET UNIMES), com diagnóstico clínico de doença neoplásica mamária e submetidas a tratamento cirúrgico.

Os proprietários dos animais ingressantes no projeto foram submetidos a questionário epidemiológico e solicitados a comparecer nos períodos estabelecidos para acompanhamento do animal e colheita de material para exames.

Por ocasião do primeiro atendimento, os animais foram submetidos a exame físico completo, estadiamento tumoral pelo sistema TNM onde **T** – tamanho do tumor – foi considerado diâmetro do maior tumor quando de apresentação múltipla, **N** – invasão ou não dos linfonodos regionais por células tumorais diagnosticada por exame citológico e/ou histopatológico e **M** – metástase à distância, proposto por Owen LN: *Classification of tumors in domestic animals*, Genova 1980, WHO – World Health Organization, conforme Lana, Rutteman e Withrow (2007). Também foram realizados exames laboratoriais pré-operatórios incluindo-se eletrocardiograma, radiografias torácicas em três incidências (latero-laterais direita e esquerda e ventro-

dorsal) e ultra-sonografia abdominal para pesquisa de metástases assim como hemograma e bioquímica renal e hepática. Após a avaliação inicial, os animais foram submetidos a acompanhamento subsequente, com intervalo de 90 dias, exceto os animais submetidos a tratamento quimioterápico, cujo acompanhamento foi determinado pelo protocolo antineoplásico adotado.

Foram considerados critérios de exclusão os animais com histórico de mastectomia prévia motivada por doença neoplásica (recidiva ou nova apresentação dos tumores), animais com carcinoma mamário inflamatório (um animal), animais submetidos a tratamento quimioterápico prévio, animais que desenvolveram outros tumores malignos após o diagnóstico da doença neoplásica mamária (dois animais com mastocitoma e um animal com carcinoma cutâneo de células escamosas), animais que desenvolveram nova apresentação de neoplasia mamária na cadeia remanescente após o primeiro atendimento (sete animais) e animais com registros médicos incompletos ou duvidosos.

Todos os proprietários dos animais, ao assinar o *Termo de Autorização para Cirurgia* estavam acordo que as informações de prontuário médico e todo e qualquer material colhido de seu animal poderiam ser utilizados como objeto de estudo.

3.3.2 Amostras de tecido tumoral

Durante o ato cirúrgico das fêmeas incluídas neste estudo, foram colhidas amostras de tecido tumoral da glândula afetada e de tecido glandular considerado clinicamente normal, da região de glândulas torácicas de fêmeas selecionadas para compor o grupo controle (portadora de nódulo único, menor de 3 cm e em região de mama inguinal ou abdominal caudal).

Consideraram-se critérios de inclusão, tecido com diagnóstico pós-operatório de glândula mamária normal, de lesão mamária não-neoplásica ou doença neoplásica de origem epitelial. Considerou-se critério de exclusão as neoplasias mesenquimais em região de mama.

Foi colhido, também, material dos linfonodos de quarenta e seis animais (43 deles colhidos os linfonodos inguinais e 3 deles também os linfonodos axilares) para estudo histopatológico e pesquisa de metástase. Os demais animais não tiveram

seus linfonodos colhidos ou por dificuldade de localização por parte do cirurgião ou devido à invasão da região pelo tecido tumoral que impediu macroscopicamente seu isolamento.

3.3.3 Exame histopatológico e gradação tumoral

As amostras teciduais, previamente fixadas em formalina a 10% por 36 a 48 horas, foram desidratadas por sucessivas passagens em alcoóis com graus de hidratação decrescentes, diafanizadas em xilol, incluídas em parafina de uso histológico e montadas em cassete para histologia. A seguir, foram cortadas em micrótomo em fragmentos com espessura de 5µm e montadas em lâmina de vidro para, então, serem submetidas às técnicas de coloração por hematoxilina e eosina visando tipificação e gradação tumoral.

Para efeito de classificação histológica e gradação tumoral, foram considerados os critérios propostos por Cassali et al. (2011) e Goldschmidt et al. (2011).

3.3.4 Marcação imunoistoquímica

As amostras conservadas em parafina foram cortadas em micrótomo em fragmentos de espessura 5µm e montadas em lâminas silanizadas para posteriormente serem submetidas ao estudo imunoistoquímico e determinação da expressão dos marcadores tumorais deste estudo.

Foram utilizados como anticorpo primário anticorpo monoclonal de camundongos anti-ERα (DAKO® clone 1D5 diluição 1:50), anticorpo policlonal de coelhos anti-PR (Santa Cruz® SC-538 diluição 1:500); anticorpo policlonal de coelhos anti-proteína HER2*neu* humana (DAKO® diluição 1:200) e anticorpo monoclonal de camundongos anti-Ki67 humano (DAKO® clone MIB1 diluição 1:150) utilizando-se dos procedimentos de coloração adaptados a cada anticorpo específico, segundo recomendação dos diversos fabricantes.

Resumidamente, lâminas com cortes das preparações com de 5µm de espessura foram desparafinizadas em xilol, gradualmente hidratadas em etanol e imersas em tampão fosfato 0.01M, pH 7,4 com Tween 20 a 0,05% (PBST) para, então, serem submetidas à recuperação antigênica com tampão EDTA 1mM pH 9.0 em panela de pressão por 3 minutos após o início da fervura, exceto para receptor de estrógeno, para o qual foi utilizado tampão citrato 10 mM pH 6,0 em panela de pressão elétrica Pascal (Pascal S2800 DakoCytomation) por 30 segundos a 124°C e 22 ATM de pressão.

A seguir, as amostras foram submetidas ao bloqueio de peroxidases endógenas com peróxido de hidrogênio a 3% em água destilada por 60 minutos a temperatura ambiente e imersas em PBST em três passagens de um minuto cada. Subsequentemente as lâminas foram incubadas com soro de bloqueio TNB® (tampão de bloqueio Tris-NaCl CSH Protocols™) em câmara úmida por 60 minutos a temperatura ambiente, exceto para receptor de estrógeno, cujo bloqueio foi realizado com leite desnatado a 12%, por 30 minutos. Após o período de bloqueio as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário específico em temperatura de 4°C em câmara úmida por uma noite. Ao término do período de incubação, as preparações foram imersas em PBST como descrito e submetidas ao complexo polímero-anticorpo secundário utilizando-se o kit EnVision™ (K4061 EnVision™+Dual Link System-HRP DakoCytomation), exceto para a marcação de ERα para a qual foi utilizado o complexo polímero-anticorpo HistoFine® (Simple Stain™ MAX PO). Após a ação do anticorpo secundário por 30 minutos, as lâminas foram novamente imersas em PBST e submetidas à revelação com uso de diaminobenzidina (K3466 Liquid DAB Large Volume Substrate Chromogen System 3'3 diaminobenzidine, DakoCytomation), contracoradas com Hematoxilina de Mayer, desidratadas por sucessivas passagens em alcoóis progressivamente mais concentrados e xilol e finalmente montadas com Permount® e lamínula. Como controle positivo foram usados cortes histológicos que apresentaram marcação positiva durante a padronização dos diversos anticorpos em estudo e como controle negativo foram utilizados fragmentos histológicos positivos para os quais foi omitido o anticorpo primário, exceto para os anticorpos monoclonais de camundongo, para os quais foi utilizado como controle negativo anticorpo isotipo IgG.

3.3.5 Aquisição de imagem e contagem da marcação imunoistoquímica

Ao fim do estudo imunoistoquímico os cortes histológicos foram avaliados em microscópio NIKON® em campos de 100, 200 e 400 aumentos. Na dependência da qualidade do corte histológico, cinco a 10 campos de aumento 400x de cada lâmina foram aleatoriamente selecionados, exceto quando de recomendação contrária, como para Ki67 e suas imagens registradas por meio de software de aquisição de imagem Image-Pro Plus versão 4.5.0.29® (Media Cybernetics™, Inc.). As imagens assim obtidas foram submetidas à contagem manual de células não marcadas, marcadas fracamente, com marcação intermediária e marcação forte, totalizando-se a contagem mínima de 500 células por lâmina, utilizando-se do mesmo programa de imagem.

3.3.6 Obtenção dos escores e índices de marcação tumoral

Os dados obtidos das contagens dos diversos marcadores foram convertidos em escores conforme o marcador em estudo.

Para os receptores de estrógeno e progesterona, visando comparação de metodologia, utilizou-se a conversão dos escores seguindo o modelo *Histosome* (*Hscore*), no qual se multiplica a porcentagem de células com marcação fraca por um, porcentagem de células com marcação moderada por 2 e porcentagem de células com marcação forte por 3 para se obter o escore entre 0 (zero) e trezentos, segundo Gatus et al. (2011) e recomendado por Peña et al. (2013) para o qual tumores com *Hscore* ≥ 20 são considerados positivos. Utilizou-se, também, a classificação por meio de escore obtido pela contagem de células positivas e sua relação com o total de células (positivas e negativas) contadas, obtendo-se escore de 0 (zero) a 100 onde são considerados positivos os tumores com $\geq 10\%$ de células positivamente marcadas, conforme Gama, Alves e Schmitt (2010); Guil-Luna et al. (2011) e Colodel et al. (2012).

O Índice de Proliferação de Ki67 (Ki67IP) foi determinado pela área de maior concentração de células (*hotspot*) com marcação nuclear, sendo considerada

positiva a célula com núcleo de coloração marrom-acastanhada de intensidade moderada e forte, conforme indicado por Pereira et al. (2013).

Levando-se em consideração a ampla margem de aceitação dos limites de corte admitidos na literatura, que variam de 2,5% a 25% (BUISHAND; KIK; KIRPENSTEIJN, 2010; DOWSETT et al., 2011; FASCHING et al., 2011), considerou-se comparar o limite de corte de 10%, proposto por Kean et al. (2011) com o limite de 14% de células positivas, proposto por Goldhirsch et al. (2011).

A imunorreatividade de HER2 foi avaliada seguindo-se os mesmos critérios descritos no sistema de pontuação HercepTest (DAKO®) e aceito pela American Association of Clinical Oncology – ASCO: **escore 0** – ausência de coloração ou coloração das membranas citoplasmáticas em menos de 10% das células; **escore 1+** – coloração fraca, quase imperceptível, em mais de 10% das células tumorais. As células são coradas em parte das membranas; **escore 2+** - coloração fraca a moderada em toda a circunferência da membrana, observada em mais de 10% das células tumorais; **escore 3+** – coloração intensa em toda a membrana, observada em mais de 10% das células tumorais (HARRIS et al., 2007). Foram considerados negativos os tumores com escore 0 e 1+, positivo fraco os tumores com escore 2+ e os tumores positivo forte aqueles com escore 3+, conforme Sales, Rodrigues e Bacchi (2004). No entanto, para fins de análise de sobrevida e classificação molecular dos tumores, somente os tumores com escores 3+ foram considerados positivos, segundo recomendação de Peña et al. (2013).

A escolha final do limite de corte dos marcadores para este estudo baseou-se nos resultados obtidos frente a diversos modelos matemáticos como Qui-quadrado, Kaplan-Meier e modelo proporcional de risco de Cox tendo em vista os parâmetros clínicos relevantes como linfonodo positivo, presença de metástase pulmonar, estadiamento clínico e sobrevida.

3.3.7 Classificação molecular dos tumores

Para efeito de classificação molecular dos tumores malignos, os escores obtidos dos marcadores ER α , PR, Ki67 e HER2 foram convertidos em variável categórica (tumor com imunorreatividade positiva e negativa) e submetidos à

metodologia utilizada, em Medicina Veterinária, por Sassi et al. (2010), identificada neste trabalho por CMSa ou pelo modelo proposto, em Medicina, por Goldhirsch et al. (2011), denominado neste trabalho por CMGs, que introduziu a marcação de Ki67 na tentativa de subclassificar os tumores luminais A, conforme quadros 1 e 2.

Quadro 1 - CMSa - Modelo de classificação molecular de neoplasias mamárias caninas proposto por Sassi et al. (2010) – São Paulo – 2014

Subtipo tumoral	ER α	PR	HER2	Citoceratinas CK5/6
Luminal A	positivo ou negativo	positivo ou negativo	Negativo	..
Luminal B	positivo ou negativo	positivo ou negativo	Positivo	..
HER2	Negativo	negativo	Positivo	..
triplo negativo ou tipo basal	Negativo	negativo	Negativo	Positivos

Embora a classificação utilizada por Sassi et al. (2010) envolva a marcação por citoceratinas para subclassificação do subtipo “basal”, este trabalho seguiu as recomendações de Goldhirsch et al. (2011) e Ferguson et al. (2013) conforme revisão de literatura, item 3.2.

Quadro 2 - CMGs - Modelo de classificação molecular de neoplasias mamárias humanas proposto no *St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011* - Goldhirsch et al. (2011) – São Paulo – 2014

Subtipo tumoral	ER α	PR	HER2	Ki67IP
luminal A	positivo ou negativo	positivo ou negativo	negativo	qualquer score
luminal B HER2-	positivo ou negativo	positivo ou negativo	negativo	positivo (> 14% de células positivamente marcadas)
luminal B HER2+	positivo ou negativo	positivo ou negativo	positivo	qualquer score
HER2	Negativo	negativo	positivo	qualquer score
triplo negativo ou basal	Negativo	negativo	negativo	qualquer score

3.3.8 Avaliação da sobrevida

Foram considerados para este estudo os animais com diagnóstico de neoplasia mamária há, pelo menos, 18 meses, equivalente a 5 anos de

acompanhamento em seres humanos, conforme sugerido por Lebeau² (1953 apud DAGLI, 2008, p. 229) totalizando 40 meses de estudo.

Para fins estatísticos foi considerado o início do período de segmento a data da mastectomia e evento final a morte inequivocamente associada à doença neoplásica maligna, tal como morte por caquexia neoplásica ou eutanásia decorrente a metástase pulmonar ou outra complicação decorrente da doença.

3.3.9 Análise estatística

Os dados obtidos foram avaliados quanto a presença de *outliers* e comparados utilizando-se correlação de Pearson e Spearman em busca de correlação entre os marcadores e por meio ANOVA simples seguido de pós-teste de Dunnett (comparação dos grupos em teste com grupo controle). Devido à possibilidade do comportamento destes marcadores seguir padrão não Gaussiano os dados foram submetidos ao teste de normalidade de D'Agostino e Pearson para, então, serem submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA). Em caso contrário, foi utilizada análise não-paramétrica com Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunns.

Para avaliar a significância da distribuição dos marcadores em relação ao tipo histológico e grau histopatológico tumoral, os escores obtidos foram transformados em variável categórica (positivo/negativo) segundo os critérios descritos no item 2.3.6 e avaliados pelo método do Qui-quadrado de Pearson ou pelo Teste Exato de Fischer, quando aplicável.

O estudo de sobrevida foi realizado com as variáveis categorizadas, por meio de análise estatística univariada utilizando-se o modelo de riscos de COX e método de Kaplan-Meier para obtenção das curvas de sobrevida e teste de log-rank de Mantel-Cox para comparação entre os grupos.

A análise de sobrevida multivariada foi realizada utilizando-se do modelo de riscos proporcionais de Cox.

² LEBEAU, A. L'âge du chien et celui de l'homme. Essai de statistique sur la mortalité canine. **Bulletin de l'Academie Veterinaire de France**, v. 26, p. 229-232, 1953.

Foi considerado grupo controle na avaliação dos marcadores frente ao tipo histológico e grau histopatológico do tumor as amostras de tecido mamário com lesão epitelial não neoplásica e os tumores benignos (grupo Ctrl).

Considerou-se diferença estatisticamente significativa $P < 0,05$ e intervalo de confiança de 95% (IC 95%).

Para os cálculos estatísticos foram utilizados os programas Prism 5 *for* Windows® v. 5.0 (GraphPad Prism®) – ANOVA, Kaplan-Meier e construção dos gráficos e MedCalc v. 12.7.7 *for* Windows® (MedCalc software bvba) para pesquisa de valores atípicos (*outliers*) e para os testes do Qui-quadrado de Pearson, correlação de Pearson, correlação de Spearman e modelo de riscos proporcionais de Cox.

3.4 RESULTADOS

O grupo estudado foi composto por 70 animais da espécie canina, de sexo feminino, com idade mínima ao diagnóstico de 5,1 anos e máxima de 16,4 (media de $10,15 \pm 2,81$ anos) e de diversas raças, com maior prevalência para os animais sem raça definida, correspondendo a 31,4% dos indivíduos e da raça poodle, correspondendo a 15% dos animais atendidos, conforme sumarizado na tabela 5.

Tabela 5 - Distribuição dos animais do experimento em função da raça – São Paulo – 2014

Raça	n (%)
Srd	22 (31,4%)
Poodle	15 (21,4%)
cocker spaniel inglês	6 (8,6%)
miniatura pinscher	5 (7,1%)
Pactó Alemão	3 (4,3%)
Rotweiler	3 (4,3%)
Boxer	2 (2,9%)
pit Bull	2 (2,9%)
shi tzu	2 (2,9%)
Teckel	2 (2,9%)
Beagle	1 (1,4%)
bichon frise	1 (1,4%)
Dobermann	1 (1,4%)
dog alemão	1 (1,4%)
Dogo argentino	1 (1,4%)
fox terrier	1 (1,4%)
golden retriever	1 (1,4%)
yorkshire terrier	1 (1,4%)
Total	70 (100%)

srd – animais sem raça definida

Em relação ao estado reprodutivo, 17 animais (24,3%) possuíam histórico de castração prévia com idade mínima à esterilização de 2,8 anos e máxima de 14,4 anos de vida (média de 7,8 anos $\pm$ 3,5 anos), em sua maioria motivada por hiperplasia endometrial cística e piometra. Não houve relato de utilização de hormonioterapia anticoncepcional nas fêmeas incluídas neste estudo.

Segundo informações obtidas dos proprietários, o intervalo entre a percepção das manifestações clínicas da doença mamária e a procura por assistência médica veterinária variou de um mês a 60 meses (média de 11,2 $\pm$ 14,13 meses), porém, dez proprietários não souberam precisar o início da doença.

Clinicamente, vinte animais apresentaram nódulos mamários em ambas as cadeias. Quando da apresentação em cadeia única, a maior prevalência ocorreu na cadeia mamária direita (29 animais). O acometimento da mama inguinal foi o evento mais comum (34 animais). Quatro animais do grupo de estudo apresentavam diagnóstico radiográfico de metástase pulmonar por ocasião do diagnóstico de doença neoplásica mamária, porém, em nenhum dos animais foi diagnosticada doença metastática abdominal por ocasião do exame ultrassonográfico abdominal. Em relação ao aspecto clínico dos tumores, o diâmetro médio obtido foi de 5,4 $\pm$ 3,9

cm (menor tumor medido com 1,0 cm de diâmetro e o maior tumor medido com 20 cm de diâmetro), 13 animais apresentaram tumores aderidos aos tecidos profundos, e 17 deles com tumores ulcerados.

Do material obtido dos linfonodos inguinais e axilares, sete apresentaram diagnóstico positivo de invasão tumoral ao exame histopatológico e 39 nove deles com diagnóstico negativo.

Em função do estadiamento clínico os animais tiveram sua sobrevida avaliada com base na classificação de TNM pelo método de Kaplan-Meier e teste de log-rank de Mantel-Cox, obtendo-se diferença altamente significativa entre os diferentes estádios, com $P < 0,0001$ no teste $X^2 = 39,99$ GL = 4 e significância no modelo Cox de riscos proporcionais para o estágio V (HR = 28,21 95% IC 5,24 a 151,83).

O gráfico 8 apresenta a curva de sobrevida de Kaplan-Meier em função do estadiamento clínico.

Gráfico 8 – Curva de Kaplan-Meier de probabilidade de sobrevida em função do estadiamento segundo sistema TNM considerando-se a data da mastectomia evento inicial e a morte por neoplasia mamária maligna evento final. Teste log-rank de Mantel-Cox: $P < 0,0001$; Teste tendência de Logrank: $P < 0,05$ $n = 61$ animais; I, II, III, IV e V = estágio clínico segundo sistema TNM – São Paulo – 2014

A totalidade dos animais foi submetida à mastectomia parcial, trinta dos quais submetidos à ovariossalpingohisterectomia concomitante e 7 deles à quimioterapia neoadjuvante. Deste último grupo, 4 animais morreram em função da doença neoplásica mamária.

Ao final deste estudo, 39 animais ainda estavam vivos e 31 haviam morrido. Entre as mortes, 14 foram atribuídos ao câncer de mama e as demais (17 animais) a outras causas como envelhecimento natural, insuficiência cardíaca ou insuficiência renal e torção gástrica. Entre os animais que morreram em decorrência da doença neoplásica mamária, uma das pacientes apresentou recidiva da doença e sofreu eutanásia por esta razão.

Dos setenta animais atendidos foram obtidos 78 fragmentos de material proveniente de glândula mamária, dos quais, 17 corresponderam a lesão não maligna, dentre eles, 8 lesões epiteliais não-neoplásicas – LENN – (mamas torácicas controle: 3 adenoses e 5 hiperplasias tubulares), 9 tumores benignos, respondendo por 12,9% dos tumores benignos desta população. Do material restante, 61 fragmentos corresponderam a lesões malignas, equivalendo a 87,1% dos tumores malignos da população em estudo. Destes tumores, 70,5% (43 amostras) foram classificadas como de grau I, 21,3% (13 amostras) de grau II e 8,2% (5 amostras) de grau III, conforme sumariza a tabela 6.

Tabela 6 - Distribuição das lesões mamárias epiteliais por tipo e grau histopatológico – São Paulo – 2014

Lesão	Tipo	Quantidade e frequência	Grau		
			I	II	III
Benigna	Adenoma complexo	5 (7,1%)			
	Tumor misto benigno	3 (4,3%)			
	Adenoma	1 (1,4%)			
	Subtotal	09 (12,9%)			
Maligna	Carcinoma simples tubular	20 (28,6%)	17 (27,9%)	3 (4,9%)	
	Carcinoma misto	14 (20,0%)	14 (23,0%)		
	Carcinoma complexo	12 (17,1%)	8 (13,1%)	4 (6,6%)	
	Carcinoma sólido	7 (10,0%)	1 (1,6%)	3 (4,9%)	3 (4,9%)
	Carcinoma simples túbulo-papilífero	6 (8,6%)	3 (4,9%)	3 (4,9%)	
	Carcinoma inflamatório *	1 (1,4%)			1 (1,6%)
	Comedocarcinoma **	1 (1,4%)			1 (1,6%)
	Subtotal	61 (87,1%)	43 (70,5%)	13 (21,3%)	5 (8,2%)
	Total	70 (100%)			

* para fins estatísticos este tumor foi incluído no grupo dos carcinomas sólidos (Ca sld) e de grau histológico 3 (GIII)

* por apresentar padrão sólido ao redor das áreas de necrose (comedo) este tumor, para fins estatísticos, foi incluído no grupo dos carcinomas sólidos de grau III

A análise de sobrevida do grupo em estudo a partir da mastectomia e em relação ao tipo histológico do tumor não apresentou diferença estatisticamente

significativa ao teste log-rank de Mantel-Cox, com $P = 0,2070$ para sobrevida e Logrank para tendência ($P = 0,8750$), embora os animais portadores de carcinoma complexo tenham mostrado média de sobrevida de $32,2 \pm 3,49$ meses contra $23,55 \pm 5,4$ meses para animais portadores de carcinoma simples sólido.

O mesmo estudo, no entanto, considerando-se o grau histopatológico do tumor, a análise de sobrevida demonstrou diferença altamente significativa entre os grupos, com $P < 0,0001$ para sobrevida e $P = 0,0013$ para a análise de tendência no teste de Logrank, com média de sobrevida de $32,18 \pm 1,98$ meses para animais com tumores de grau I e $7,2 \pm 1,73$ meses para animais com tumores de grau histológico III, este último com diferença significativa na análise de riscos proporcionais de Cox (Fração de risco – HR – *hazard ratio* = 11,59 95% IC 3,29 a 40,76). Ambos os estudos são representados nos gráficos 9 e 10 que ilustram as curvas de Kaplan-Meier de sobrevida.

Gráfico 9 – Curva de Kaplan-Meier de probabilidade de sobrevida em relação ao tipo histológico tumoral considerando-se a data da mastectomia evento inicial e a morte por neoplasia mamária maligna evento final. Teste log-rank de Mantel-Cox: $P > 0,05$; Teste tendência de Logrank: $P > 0,05$. $n = 61$ animais; Ca cplx – carcinoma complexo; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca tbp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido – São Paulo – 2014

Gráfico 10 - Curva de Kaplan-Meier de probabilidade de sobrevida em relação ao grau histopatológico tumoral considerando-se a data da mastectomia evento inicial e a morte por neoplasia mamária maligna evento final. Teste log-rank de Mantel-Cox: $P < 0,0001$; Teste tendência de Logrank: $P < 0,05$. $n = 61$ animais; GI, GII, GIII – grau histológico tumoral – São Paulo – 2014

Utilizando-se de análise multivariada de riscos proporcionais de Cox, observou-se diferença altamente significativa para o modelo de ajuste global, indicando 94% de probabilidade que um animal em estágio V e 81% de probabilidade que um animal com tumor de grau III morra antes que animais dos demais grupos ($P = 0,0021$ para o modelo de ajuste global e $P = 0,0033$; exponencial de beta 15,78 e IC de 2,5323 a 98,424 para estágio 5 e $P = 0,0397$; exponencial de beta 5,3402 e IC de 1,0908 a 26,145 para tumores com grau histológico 3).

Buscando-se avaliar a interdependência entre os marcadores tumorais, procedeu-se ao estudo de correlação matricial submetendo-se os dados dos marcadores ER α , PR e Ki67 ao teste do Qui-quadrado e teste do Qui-quadrado para tendência.

Por se tratar de variável categórica, uma vez que sua quantificação se faz com a utilização de escore não contínuo, ou seja, zero, 1, 2 e 3, o marcador tumoral HER2 não foi incluído no teste de correlação.

Tendo em vista que valores atípicos (*outliers*) podem influenciar os cálculos de correlação, os marcadores de variável contínua (ER α , PR e Ki67) tiveram seus escores submetidos ao teste de valor atípico, no qual apenas o marcador Ki67

apresentou o escore de três animais fora da faixa de distribuição de valores e foram excluídos para efeito de análise de correlação, conforme gráficos 11A, 11B e 11C.

Gráfico 11A – Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade de ERα para detecção de valores atípicos (*outliers*). Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; n = 78 amostras tumorais – São Paulo – 2014

Gráfico 11B – Gráfico da distribuição dos escores de imunorreatividade de PR para detecção de valores atípicos (*outliers*). Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; n = 78 amostras tumorais – São Paulo – 2014

Gráfico 11C – Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade Ki67 para detecção de valores atípicos (*outliers*) no qual se notam a marcação de três valores fora da faixa de distribuição (33,7; 34,4; 47,9). Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; n = 78 amostras tumorais – São Paulo – 2014

Após a exclusão dos valores atípicos, realizou-se a análise de correlação de Pearson e de Spearman entre os marcadores ER α , PR e Ki67 tanto em conjunto quanto em pares.

Neste estudo não se demonstrou relação direta ou indireta entre estes indicadores, tanto nos resultados matemáticos quanto na distribuição gráfica das variáveis, conforme sumarizado no quadro 3.

Quadro 3 - Coeficiente de correlação de Pearson para ER α , PR e Ki67 – São Paulo – 2014

		ER α	Ki67	PR
ER α	Coeficiente de correlação		-0,145	-0,020
	nível de significância P		0,2156	0,8601
	N		75	78
Ki67	Coeficiente de correlação	-0,145		-0,033
	nível de significância P	0,2156		0,7763
	N	75		75
PR	Coeficiente de correlação	-0,020	-0,033	
	nível de significância P	0,8601	0,7763	
	N	78	75	

Buscando-se compreender o comportamento dos marcadores em estudo, os escores de cada marcador foram agrupados por tipo de diagnóstico histológico e grau histopatológico do tumor e quando na forma de variável contínua, submetidos à

análise de variância e quando na forma de variável categórica, os escores foram submetidos ao teste do Qui-quadrado.

Tendo em vista que a totalidade dos tumores foi classificada como positivos na pontuação com a análise do comportamento dos marcadores ER α e PR pelo método *Hscore*, os resultados apresentados sobre estes marcadores referem-se ao escore obtido com o método proposto por Gama, Alves e Schmitt (2010).

As figuras 4A, 4B e 4C exemplificam a marcação imunoistoquímica de ER α em tecido mamário neoplásico (Figuras 4A e 4B) e lesão epitelial não neoplásica (Figura 4C).

A análise de variância da imunorreatividade de ER α em relação ao tipo histológico tumoral demonstrou diferença estatisticamente significativa na análise de variância (ANOVA $P = 0,0251$; IC 95%) com diferença significativa entre os grupos controle vs carcinoma sólido (Ctrl vs Ca sld) no pós-teste de múltipla comparação de Dunnett. O quadro 4 sumariza as médias, desvios padrões, medianas, percentis, erro padrão e intervalo de confiança da imunorreatividade de ER α em relação ao tipo histológico tumoral.

Quadro 4 - Imunorreatividade de ER α como variável contínua vs tipo histológico tumoral – ANOVA – São Paulo – 2014

	Grupos					
	Ctrl	Ca Cplx	Ca mst	Ca spl	Ca tbp	Ca sld
Número de amostras	17	12	14	20	6	9
Escore mínimo	8,60	13,90	0,80	4,20	2,10	5,10
25% Percentil	26,65	25,65	21,15	17,15	14,33	6,70
Mediana	53,20	41,70	35,90	35,15	29,25	8,60
75% Percentil	63,45	53,88	46,40	53,20	43,98	30,65
Escore máximo	80,10	69,40	62,20	88,00	62,80	54,30
Média por grupo	47,11	41,08	33,09	35,75	29,92	17,81
Desvio padrão	21,11	17,66	17,81	23,90	20,79	17,11
Erro padrão	5,12	5,10	4,76	5,35	8,49	5,70
95% IC inferior	36,25	29,86	22,80	24,56	8,10	4,66
95% IC superior	57,96	52,30	43,37	46,94	51,73	30,96

Ctrl – controle; Ca cplx – carcinoma complexo; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca tbp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido

Figura 4 - Imagens fotográficas de padrões de imunorreatividade de ER α de lâminas de corte histológico de tecido mamário neoplásico ou LENN, obtidas com câmara digital acoplada à ocular de microscópio de luz. Magnitude equivalente a 400x – São Paulo – 2014

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental da FMVZ/USP

Fotomicrografias quando digitalizadas e manejadas por editores de texto perdem sua relação com a magnitude que originalmente a gerou. Por esta razão, não foi incluída barra de escala nas imagens

O gráfico 12 apresenta a distribuição dos escores de ER α em forma de variável em função do tipo histológico do tumor

Gráfico 12 – Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade de ER α em forma de variável contínua (porcentagem de células imunorreativas em relação ao total de células contadas), agrupados em função do tipo histológico tumoral. Média do grupo controle (Ctrl) 47,11 $\pm$ 21,11 $P < 0,05$ IC de 95% ANOVA. Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; * diferença significativa ($P < 0,05$ no pós-teste de Dunnett de múltipla comparação) entre o grupo Ctrl e o grupo marcado com o mesmo sinal; Ctrl – controle; Ca cplx – carcinoma complexo; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca tbp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido; n = 78 amostras tumorais – São Paulo – 2014

Utilizando-se o limite de corte de 10% e transformados os escores em variável categórica (positivo/negativo) e submetidos ao teste do Qui-quadrado, a distribuição dos escores também apresentou diferença significativa entre os grupos ($X^2 = 19,00$; $P = 0,0019$; GL = 5 e coeficiente de contingência (CC) de 0,44). Foi aplicado, também, o Teste do Qui-quadrado para tendência ($X^2 = 12,95$ GL = 1 e $P = 0,0003$) denotando a diminuição da proporção de tumores positivos em relação ao número de tumores negativos, em função do aumento do grau de malignidade. A tabela 7 apresenta divisão de grupos segundo o tipo histológico do tumor e a distribuição dos escores positivos e negativos entre os grupos, enquanto o gráfico 13 apresenta a distribuição gráfica dos referidos grupos em função do escore de ER α positivo ou negativo, segundo limite de corte estabelecido previamente e o tipo histológico do tumor.

Tabela 7 - Frequência dos escores segundo tipo histológico do tumor e reação do marcador ER α para teste do Qui-quadrado – São Paulo – 2014

Escore	Tipo histológico do tumor						Total
	Ctrl	Ca cplx	Ca mst	Ca spl	Ca tbp	Ca sld	
Negativo	1 (5,9%)	0 (0,0%)	2 (14,3%)	4 (20,0%)	1 (16,7%)	6 (66,7%)	14 (17,9%)
Positivo	16 (94,1%)	12 (100,0%)	12 (85,7%)	16 (80,0%)	5 (83,3%)	3 (33,3%)	64 (82,1%)
Total	17 (21,8%)	12 (15,4%)	14 (17,9%)	20 (25,6%)	6 (7,7%)	9 (11,5%)	78

Ctrl – controle; Ca cplx – carcinoma complexo; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca tbp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido

Gráfico 13 – Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade de ER α em forma de variável categórica (tumor positivo ou negativo conforme limite de corte: tumor positivo $\geq$ 10% de células positivas) e em função do tipo histológico tumoral. $X^2 = 19,00$ $P = 0,0019$ GL = 5 e coeficiente de contingência de 0,44. X^2 para tendência = 12,95 $P = 0,0003$ GL = 1. Ctrl – controle; Ca cplx – carcinoma complexo; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca tbp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido; n = 78 amostras – São Paulo – 2014

ER α vs tipo histológico do tumor

Os mesmos testes foram aplicados na análise do comportamento do marcador ER α frente ao grau histopatológico do tumor.

Na análise de variância, obteve-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA $P = 0,0021$; IC 95%) para o grau histopatológico do tumor, entre os grupos controle vs grau 3 (GIII) no pós-teste de múltipla comparação de Dunnett.

O quadro 5 e o gráfico 14 apresentam as médias, medianas, desvios padrões, distribuição em percentil e intervalos de confiança para cada um dos grupos em estudo.

Quadro 5 - Imunorreatividade de ER α como variável contínua vs grau histológico tumoral – ANOVA – São Paulo – 2014

	Grupos			
	Ctrl	GI	GII	GIII
Número de amostras	17	43	13	5
Escore mínimo	8,60	0,80	4,60	5,10
25% Percentil	26,65	17,40	20,10	5,15
Mediana	53,20	37,60	31,20	8,20
75% Percentil	63,45	52,10	45,25	8,80
Escore máximo	80,10	88,00	62,80	9,10
Média por grupo	47,11	36,16	32,32	7,22
Desvio padrão	21,11	21,22	16,55	1,92
Erro padrão	5,12	3,24	4,59	0,86
95% IC inferior	36,25	29,63	22,31	4,84
95% IC superior	57,96	42,69	42,32	9,60

Ctrl – controle; Ca cplx – carcinoma complexo; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca tbp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido

Também em relação ao grau histopatológico do tumor procederam-se à análise de Qui-quadrado e análise de tendência, convertendo os escores de ER α em variável categórica. À análise do Qui-quadrado, obteve-se diferença estatística altamente significativa entre os grupos, com $X^2 = 25,55$ e $P < 0,0001$, GL = 3. Também o teste do Qui-quadrado para tendência apresentou diferença significativa, com $X^2 = 10,91$, $P = 0,001$, GL 1. A tabela 8 apresenta divisão de grupos segundo o grau histopatológico do tumor e a distribuição dos escores positivos e negativos entre os grupos. O gráfico 15 apresenta a distribuição dos referidos grupos.

Gráfico 14 – Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade de ER α em forma de variável contínua (porcentagem de células imunorreativas em relação ao total de células contadas), agrupados em função do grau histológico tumoral. Média do grupo controle (Ctrl) $47,11 \pm 21,11$ $P = 0,0021$ IC de 95% ANOVA. Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; * diferença significativa ($P < 0,05$ no pós-teste de Dunnett de múltipla comparação) entre o grupo Ctrl e o grupo marcado com o mesmo sinal. Ctrl – controle, GI, GII, GIII – grau histológico 1, 2 e 3; $n = 78$ amostras tumorais – São Paulo – 2014

Tabela 8 - Frequência dos escores segundo grau histológico do tumor e reação do marcador ER α para teste do Qui-quadrado – São Paulo – 2014

Escore	Grau				Total
	Ctrl	GI	II	GIII	
Negativo	1 (5,9%)	7 (0%)	1 (14,3%)	5 (100,0%)	14 (17,9%)
Positivo	16 (94,1%)	36 (100,0%)	12 (85,7%)	0 (0%)	64 (82,1%)
Total	17 (21,8%)	43 (55,1%)	13 (16,7%)	5 (6,4%)	78

Ctrl – controle, GI, GII, GIII – grau histológico 1, 2 e 3

Gráfico 15 - Representação gráfica da distribuição dos escores de ER α em forma de variável categórica (tumor positivo ou negativo conforme limite de corte: tumor positivo $\geq$ 10% de células positivas) e em função do grau histopatológico tumoral. $X^2 = 25,55$ $P < 0,0001$ GL = 3. X^2 para tendência = 10,91 $P = 0,001$ GL 1 $n = 78$ amostras tumorais; Ctrl – controle; GI, GII, GIII – grau histológico – São Paulo – 2014

Visando avaliar a influência hormonal na expressão dos receptores de estrógeno, procedeu-se análise estatística da imunorreatividade de ER α tanto como variável contínua como variável categórica, ambas em função do estado reprodutivo das fêmeas deste estudo. Obteve-se, assim, diferença significativa tanto no teste t de Student, para variável contínua (média de $24,77 \pm 17,63$ para os animais castrados e $37,30 \pm 21,01$ para os animais não castrados $P = 0,0295$ 95% IC), quanto no Teste Exato de Fischer ($P = 0,0312$), conforme ilustrado nos gráficos 16A e 16B.

Gráfico 16A - Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade de ER α em forma de variável contínua (porcentagem de células imunorreativas em relação ao total de células contadas), agrupados em função do estado reprodutivo do animal. Média dos animais castrados $24,77 \pm 17,63$ $P < 0,05$ IC 95% Teste t de Student. Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; $n = 70$ animais – São Paulo – 2014

Gráfico 16B - Representação gráfica da distribuição dos escores de ER α em forma de variável categórica (tumor positivo ou negativo conforme limite de corte: tumor positivo $\geq 10\%$ de células positivas) e em função do estado reprodutivo do animal. $P < 0,05$ Teste Exato de Fisher. $n = 70$ animais – São Paulo - 2014

Também a expressão do marcador ER α foi avaliada em função da presença de metástase pulmonar e linfonodo regional comprometido. Não havendo

significância entre as médias, nos testes paramétrico (ANOVA) e não paramétrico (Kruskal-Wallis) com 1 animal negativo em 4 animais portadores de metástase pulmonar e 2 animais negativos em 7 animais com linfonodos positivos, na classificação dos tumores em variável categórica.

Encerrando os estudos isolados do marcador ER α , tomando-se como base de corte a marcação de 10% de células positivas, procedeu-se à avaliação da sobrevida das pacientes em função deste marcador. A análise de log-rank para fração de sobrevida em função de ER α não apresentou diferença significativa entre os grupos, com $P = 0,4843$ ($X^2 = 0,4891$ GL = 1; 95% IC), com média de sobrevida de $28,0 \pm 4,14$ meses para os animais com tumores negativos e de $30,2 \pm 2,1$ meses para animais com tumores positivos para ER α . A análise de Fração de Risco (Hazard ratio HR) não foi considerada significativa tendo em vista que 95% de seu intervalo de confiança manteve-se na faixa de 0,172 a 2,304. O gráfico 17 apresenta a curva de Kaplan-Meier de sobrevida para este marcador em função da imunorreatividade de ER α como variável categórica.

Gráfico 17 - Curva de Kaplan-Meier de probabilidade de sobrevida em função da imunorreatividade do marcador tumoral ER α considerando-se a data da mastectomia evento inicial e a morte por neoplasia mamária maligna evento final. Teste log-rank de Mantel-Cox: $P > 0,05$ $X^2 = 0,489$ GL 1; Fração de Risco (HR – Hazard ratio) = 0,6295 95% IC = 0,172 a 2,304. n = 61 animais – São Paulo – 2014

O segundo marcador estudado foi o receptor de progesterona. As figuras 5A, 5B e 5C exemplificam a marcação imunoistoquímica de PR em tecido mamário

neoplásico. As imagens mostram importante marcação de fundo (*background*), característica de menor especificidade dos anticorpos policlonais.

Figura 5 - Imagens fotográficas de padrões de imunorreatividade de PR de lâminas de corte histológico de tecido mamário neoplásico ou LENN, obtidas com câmara digital acoplada à ocular de microscópio de luz. Magnitude equivalente a 400x. – São Paulo – 2014

Figura 5A – Fotomicrografia de corte histológico de neoplasia mamária com estudo imunoistoquímico para PR, obtida com microscópio óptico em campo de alta magnitude (400x). Embora haja marcação de fundo, os núcleos se encontram em sua maioria não marcados (coloração cian) em um carcinoma misto de grau I

Figura 5B – Fotomicrografia de corte histológico de neoplasia mamária com estudo imunoistoquímico para PR, obtida com microscópio óptico em campo de alta magnitude (400x). Marcação nuclear moderada (núcleos com coloração marrom claro) em um carcinoma simples sólido

Figura 5C – Fotomicrografia de corte histológico de tecido mamário com estudo imunoistoquímico para PR, obtida com microscópio óptico em campo de alta magnitude (400x). Marcação nuclear intensa (núcleos com marcação marrom escura), apesar da marcação acessória de fundo na região de mama normal em uma hiperplasia tubular

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental da FMVZ/USP

Fotomicrografias quando digitalizadas e manejadas por editores de texto perdem sua relação com a magnitude que originalmente a gerou. Por esta razão, não foi incluída barra de escala nas imagens

Na análise de variância da imunorreatividade de PR como variável contínua em relação ao tipo histológico do tumor, não houve diferença estatisticamente significativa no teste de ANOVA com $P = 0,9039$ para IC de 95% e resultado não significativo no pós-teste de Dunnett.

O quadro 6 e o gráfico 18 sumarizam as médias, medianas, desvios padrões, distribuição em percentil e intervalos de confiança para cada um dos grupos em estudo em relação ao marcador PR e em função do tipo histológico.

Quadro 6 - Imunorreatividade de PR como variável contínua vs tipo histológico tumoral – ANOVA – São Paulo – 2014

	Grupos					
	Ctrl	Ca Cplx	Ca MST	Ca spl	Ca tbp	Ca sld
Número de amostras	17	12	14	20	6	9
Escore mínimo	18,00	10,30	0,30	14,00	3,30	4,30
25% Percentil	29,00	33,08	22,83	23,78	9,08	9,00
Mediana	48,00	40,50	51,65	43,15	39,50	57,30
75% Percentil	61,35	55,30	64,40	58,98	77,15	88,70
Escore máximo	89,00	79,00	79,00	98,00	85,70	98,00
Média por grupo	48,73	41,90	43,99	44,94	42,22	53,30
Desvio padrão	19,28	19,02	26,49	21,97	32,94	37,29
Erro padrão	4,68	5,49	7,08	4,91	13,45	12,43
95% IC inferior	38,82	29,82	28,70	34,65	7,64	24,64
95% IC superior	58,64	53,98	59,29	55,22	76,79	81,96

Ctrl – controle; Ca cplx – carcinoma complexo; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca tbp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido

Gráfico 18 - Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade de PR em forma de variável contínua (porcentagem de células imunorreativas em relação ao total de células contadas), agrupados em função do tipo histológico tumoral. Média do grupo controle (Ctrl) $48,73 \pm 19,28$. $P > 0,05$ IC de 95% ANOVA. Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; * diferença significativa ($P < 0,05$ no pós-teste de Dunnett de múltipla comparação) entre o grupo Ctrl e o grupo marcado com o mesmo sinal; Ctrl – controle; Ca cplx – carcinoma complexo; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca tbp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido; $n = 78$ amostras tumorais – São Paulo – 2014

Situação semelhante foi observada na avaliação do comportamento do marcador PR como variável contínua em função do grau histopatológico do tumor, com $P = 0,851$ no teste de ANOVA e no pós-teste de Dunnett de múltipla comparação.

O quadro 7 e o gráfico 19 sumarizam as médias, medianas, desvios padrões, distribuição em percentil e intervalos de confiança para cada um dos grupos em estudo em relação ao marcador PR em função do grau histopatológico tumoral.

Quadro 7 - Imunorreatividade de PR como variável contínua vs grau histológico tumoral – ANOVA – São Paulo – 2014

	Grupos			
	Ctrl	GI	GII	GIII
Número de amostras	17	43	13	5
Escore mínimo	18,00	0,30	4,30	8,30
25% Percentil	29,00	26,70	13,50	9,00
Mediana	48,00	48,30	40,70	56,00
75% Percentil	61,35	64,30	54,15	83,35
Escore máximo	89,00	92,70	98,00	98,00
Média por grupo	48,73	46,00	40,92	48,14
Desvio padrão	19,28	23,83	28,03	38,84
Erro padrão	4,68	3,63	7,78	17,37
95% IC inferior	38,82	38,66	23,98	-0,09
95% IC superior	58,64	53,33	57,85	96,37

Ctrl – controle, GI, GII, GIII – grau histológico 1, 2 e 3

Gráfico 19 - Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade de PR em forma de variável contínua (porcentagem de células imunorreativas em relação ao total de células contadas), agrupados em função do grau histológico tumoral. Média do grupo controle (CTRL) $48,73 \pm 19,28$ $P > 0,05$ IC de 95% ANOVA. Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; * diferença significativa ($P < 0,05$ no pós-teste de Dunnett de múltipla comparação) entre o grupo Ctrl e o grupo marcado com o mesmo sinal. Ctrl – controle, GI, GII, GIII – grau histológico 1, 2 e 3; n = 78 amostras tumorais – São Paulo – 2014

Assim como para o marcador ER α , os escores de PR foram convertidos em variável categórica e submetidos ao teste do Qui-quadrado. Diferentemente dos

achados dos testes de ANOVA, no entanto, o teste do Qui-quadrado apresentou resultado estatístico significativo para ambos os grupos (tipo histológico e grau histopatológico do tumor) com $X^2 = 13,95$, $P = 0,0159$ para GL 5 e CC = 0,39 para a classificação por tipo histológico tumoral e $X^2 = 8,80$, $P = 0,0321$ para GL 3 com X^2 para tendência = 5,86; $P = 0,0155$ para GL 1 para a classificação por grau histopatológico do tumor. As tabelas 9 e 10 e os gráficos 20 e 21 sumarizam os resultados ora descritos.

Tabela 9 - Frequência dos escores segundo tipo histológico do tumor e reação do marcador PR para teste do Qui-quadrado – São Paulo – 2014

Escore	Tipo histológico do tumor						Total
	Ctrl	Ca cplx	Ca mst	Ca spl	Ca tbp	Ca sld	
Negativo	0 (0%)	0 (%)	2 (14,3%)	0 (0%)	1 (16,7%)	3 (37,5%)	6 (7,7%)
Positivo	17 (100,0%)	12 (100,0%)	12 (85,7%)	20 (100,0%)	5 (83,3%)	6 (75%)	72 (92,3%)
Total	17 (21,8%)	12 (15,4%)	14 (17,9%)	20 (25,6%)	6 (7,7%)	8 (11,5%)	78

Ctrl – controle; Ca cplx – carcinoma complexo; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca tbp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido

Gráfico 20 - Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade de PR em forma de variável categórica (tumor positivo ou negativo conforme limite de corte: tumor positivo $\geq 10\%$ de células positivas) e em função do tipo histológico tumoral. $X^2 = 13,95$ $P < 0,05$ GL = 3 n = 78 amostras tumorais; Ctrl – controle; Ca cplx – carcinoma complexo; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca tbp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido – São Paulo – 2014

Tabela 10 - Frequência dos escores segundo grau histológico do tumor e reação do marcador PR para teste do Qui-quadrado – São Paulo – 2014

Escore	Grau				Total
	Ctrl	GI	GII	GIII	
Negativo	0 (0%)	3 (7,0%)	1 (7,7%)	2 (40%)	6 (7,7%)
Positivo	17 (100,0%)	40 (93,0%)	12 (92,3%)	3 (60,0%)	72 (92,3%)
Total	17 (21,8%)	43 (55,1%)	13 (16,7%)	5 (6,4%)	78

Ctrl – controle, GI, GII, GIII – grau histológico 1, 2 e 3

Gráfico 21 - Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade de PR em forma de variável categórica (tumor positivo ou negativo conforme limite de corte: tumor positivo $\geq 10\%$ de células positivas) e em função do grau histopatológico tumoral. $\chi^2 = 8,80$ $P < 0,05$ GL = 3 χ^2 para tendência = 5,86 $P < 0,05$ GL 1 n = 78 amostras tumorais; Ctrl – controle; GI, GII, GIII – grau histológico – São Paulo – 2014

A influência hormonal sobre a expressão dos receptores de progesterona foi avaliada com análise estatística da imunorreatividade de PR como variável contínua e variável categórica em função do estado reprodutivo dos animais. Na análise de t de Student para variável contínua, não se obteve diferença significativa entre as médias (média de $39,20 \pm 28,45$ para os animais castrados e $47,00 \pm 23,22$ para os animais não castrados $P = 0,2571$ 95% IC), porém na avaliação pelo Teste Exato de Fischer para variável categórica, obteve-se diferença significativa entre os grupos de

animais castrados e não castrados em função da positividade do marcador ($P = 0,0276$), conforme ilustrado os gráficos 22A e 22B.

Gráfico 22A - Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade de PR em forma de variável contínua (porcentagem de células imunorreativas em relação ao total de células contadas), agrupados em função do estado reprodutivo do animal. Média dos animais castrados $39,20 \pm 28,45$ $P > 0,05$ IC de 95% Teste t de Student. Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; $n = 70$ animais – São Paulo – 2014

Gráfico 22B - Representação gráfica da distribuição dos escores de PR em forma de variável categórica (tumor positivo ou negativo conforme limite de corte: tumor positivo $\geq 10\%$ de células positivas) e em função do estado reprodutivo do animal. $P < 0,05$ Teste Exato de Fisher. $n = 70$ animais – São Paulo – 2014

Os estudos da marcação de PR em função da presença de metástase pulmonar e linfonodo regional comprometido não demonstraram significância entre as médias nos testes paramétrico (ANOVA) e não paramétrico (Kruskal-Wallis) com todos os animais portadores de metástase com escore positivo (4/4) e 2 animais negativos em 7 portadores de linfonodo comprometido.

Também para o marcador PR, tomando-se como base de corte a marcação de 10% de células positivas, procedeu-se à avaliação da sobrevida das pacientes em função deste marcador. A análise de log-rank para fração de sobrevida em função de PR também não apresentou diferença significativa entre os grupos, com $P = 0,5114$ ($X^2 = 0,4312$ GL = 1) e médias de sobrevida bastante próximas entre os grupos com tumor positivo ($30,1 \pm 1,96$ meses IC 95%) e negativos para PR ($26,8 \pm 5,87$ meses IC 95%IC). O gráfico 23 apresenta a curva de Kaplan-Meier de sobrevida em função deste marcador.

Gráfico 23 - Curva de Kaplan-Meier de probabilidade de sobrevida em função da imunorreatividade do marcador tumoral PR, considerando-se a data da mastectomia evento inicial e a morte por neoplasia mamária maligna evento final. Teste log-rank de Mantel-Cox: $P > 0,05$ $X^2 = 0,431$ GL 1; Fração de Risco (HR – hazard ratio) não significativa. n = 61 animais – São Paulo – 2014

O próximo marcador submetido a estudo estatístico foi Ki67, para o qual também foram aplicados os mesmos modelos estatísticos utilizados para os marcadores anteriores.

As figuras 6A, 6B e 6C exemplificam a marcação imunoistoquímica de Ki67 em tecido mamário neoplásico. Diferentemente da marcação de PR, este anticorpo monoclonal possui baixa marcação de fundo, facilitando a leitura das lâminas.

Figura 6 - Imagens fotográficas de padrões de imunorreatividade de Ki67 de lâminas de corte histológico de tecido mamário neoplásico, obtidas com câmara digital acoplada à ocular de microscópio de luz. Magnitude equivalente a 400x. – São Paulo – 2014

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental da FMVZ/USP

Fotomicrografias quando digitalizadas e manejadas por editores de texto perdem sua relação com a magnitude que originalmente a gerou. Por esta razão, não foi incluída barra de escala nas imagens

À semelhança do marcador tumoral ER α , Ki67 apresentou diferença significativa tanto na análise de variância da imunorreatividade, como variável contínua em relação ao tipo histológico do tumor, quanto em seu comportamento frente ao grau histopatológico tumoral. Para a relação Ki67 *versus* (vs) tipo histológico tumoral obteve-se no teste de ANOVA $P = 0,0123$ para IC de 95% e resultado significativo no pós-teste de Dunnett entre os grupos controle vs carcinoma misto (Ca mst), carcinoma tubular simples e carcinoma sólido. Em função do grau histopatológico, a imunorreatividade de Ki67 apresentou nos testes de ANOVA e Kruskal-Wallis resultados significativos com $P = 0,0036$ para IC 95% no teste de ANOVA e diferença significativa entre os grupos controle vs grupos GI, GII e GIII no pós-teste de Dunnett de múltipla comparação.

Os quadros 8 e 9 e os gráficos 24 e 25 sumarizam as médias, medianas, desvios padrões, distribuição em percentil e intervalos de confiança para cada um dos grupos em estudo, em relação ao marcador Ki67 em função do tipo histológico e grau histopatológico do tumor.

Quadro 8 - Imunorreatividade de Ki67 como variável contínua vs tipo histológico tumoral – ANOVA – São Paulo – 2014

	Grupos					
	Ctrl	Ca cplx	Ca mst	Ca spl	Ca tbp	Ca sld
Número de amostras	17	12	14	20	6	9
Escore mínimo	0,00	0,00	0,00	0,00	3,30	0,00
25% Percentil	0,00	2,73	0,00	3,50	5,63	6,60
Mediana	0,00	7,75	4,40	12,30	8,25	10,80
75% Percentil	4,35	15,23	23,78	15,90	25,03	25,45
Escore máximo	8,90	17,80	47,90	30,20	27,80	34,40
Média por grupo	2,08	8,44	11,91	12,08	13,02	14,66
Desvio padrão	3,51	6,12	14,84	9,11	10,25	11,99
Erro padrão	0,85	1,77	3,97	2,04	4,19	4,00
95% IC inferior	0,27	4,56	3,34	7,82	2,26	5,44
95% IC superior	3,88	12,33	20,47	16,34	23,78	23,87

Ctrl – controle; Ca cplx – carcinoma complexo; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca tbp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido

Gráfico 24 - Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade de Ki67 em forma de variável contínua (porcentagem de células imunorreativas em relação ao total de células contadas), agrupados em função do tipo histológico tumoral. Média do grupo controle (Ctrl) $2,08 \pm 3,51$ $P < 0,05$ IC de 95% ANOVA. Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; * diferença significativa ($P < 0,05$ no pós-teste de Dunnett de múltipla comparação) entre o grupo Ctrl e o grupo marcado com o mesmo sinal; Ctrl – controle; Ca cplx – carcinoma complexo; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca tbp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido; n = 78 amostras tumorais – São Paulo – 2014

Ki67 vs tipo histológico tumoral

Quadro 9 - Imunorreatividade de Ki67 como variável contínua vs grau histológico tumoral – ANOVA – São Paulo – 2014

	Grupos			
	Ctrl	GI	GII	GIII
Número de amostras	17	43	13	5
Escore mínimo	0,00	0,00	0,00	7,30
25% Percentil	0,00	2,80	6,15	8,25
Mediana	0,00	8,10	10,80	13,40
75% Percentil	4,35	16,40	16,70	25,45
Escore máximo	8,90	47,90	27,80	33,70
Média por grupo	2,08	11,36	11,58	16,16
Desvio padrão	3,51	11,32	8,25	10,53
Erro padrão	0,85	1,73	2,29	4,71
95% IC inferior	0,27	7,87	6,59	3,09
95% IC superior	3,88	14,84	16,56	29,23

Ctrl – controle, GI, GII, GIII – grau histológico 1, 2 e 3

Gráfico 25 - Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade de Ki67 em forma de variável contínua (porcentagem de células imunorreativas em relação ao total de células contadas), agrupados em função do grau histológico tumoral. Média do grupo controle (Ctrl) $2,08 \pm 3,51$ $P < 0,05$ IC de 95% ANOVA. Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; * diferença significativa ($P < 0,05$ no pós-teste de Dunnett de múltipla comparação) entre o grupo Ctrl e o grupo marcado com o mesmo sinal; • refere-se a valor atípico (*outlier*). Ctrl – controle, GI, GII, GIII – grau histológico 1, 2 e 3; n = 78 amostras tumorais – São Paulo – 2014

Uma vez que o limite de corte de 14%, proposto por Goldhirsch et al. (2011), não ter sido capaz de detectar os animais portadores de metástase pulmonar em sua totalidade no grupo de animais deste estudo, a ordenação dos escores dos tumores como variável categórica para teste do Qui-quadrado foi baseada no limite de corte de 10%, acima do qual os tumores foram considerados positivos para a imunorreatividade de Ki67.

Com este limite de corte, diferentemente do obtido com o limite de corte de 14% (dados não incluídos) houve diferença estatística significativa para a classificação por tipo histológico tumoral ($X^2 = 20,39$; $P < 0,05$; GL 5 e coeficiente de contingência 0,46) e para grau histopatológico do tumor apresentou ($X^2 = 14,08$ $P = 0,0028$ GL 3 e X^2 para tendência = $9,751$ $P = 0,0018$ GL = 1). As tabelas 11 e 12 e os gráficos 26 e 27 sumarizam os dados obtidos na análise da imunorreatividade de Ki67 como variável categórica e em função do tipo e grau histológicos.

Tabela 11 - Frequência dos escores segundo tipo histológico do tumor e reação do marcador Ki67 para teste do Qui-quadrado – São Paulo – 2014

Escore	Tipo histológico do tumor						Total
	Ctrl	Ca cplx	Ca mst	Ca spl	Ca tbp	Ca sld	
Negativo	17 (100,0%)	4 (33,3%)	5 (35,7%)	14 (70,0%)	2 (33,3%)	5 (55,6%)	47 (60,3%)
Positivo	0 (0%)	8 (66,7%)	9 (64,3%)	6 (30%)	4 (66,7%)	4 (44,4%)	31 (39,7%)
Total	17 (21,8%)	12 (15,4%)	14 (17,9%)	20 (25,6%)	6 (7,7%)	9 (11,5%)	78

Ctrl – controle; Ca cplx – carcinoma complexo; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca tbp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido

Gráfico 26 - Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade de Ki67 em forma de variável categórica (tumor positivo ou negativo conforme limite de corte: tumor positivo $\geq 10\%$ de células positivas) e em função do tipo histológico tumoral. $\chi^2 = 20,39$ $P < 0,05$ GL 5 e coeficiente de contingência 0,46 $n = 78$ amostras tumorais; Ctrl – controle; Ca cplx – carcinoma complexo; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca tbp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido – São Paulo – 2014

Tabela 12 - Frequência dos escores segundo grau histológico do tumor e reação do marcador Ki67 para teste do Qui-quadrado – São Paulo – 2014

Escore	Grau				Total
	Ctrl	GI	GII	GIII	
Negativo	17 (100,0%)	31 (72,1%)	9 (69,2%)	2 (40,0%)	59 (75,6%)
Positivo	0 (0%)	12 (27,9%)	4 (30,8%)	3 (60%)	19 (24,4%)
Total	17 (21,8%)	43 (55,1%)	13 (16,7%)	5 (6,4%)	78

Ctrl – controle, GI, GII, GIII – grau histológico 1, 2 e 3

Gráfico 27 - Representação gráfica da distribuição dos escores de Ki67 em forma de variável categórica (tumor positivo ou negativo conforme limite de corte: tumor positivo $\geq$ 10% de células positivas) e em função do grau histopatológico tumoral. $\chi^2 = 14,08$ $P = 0,0028$ GL 3 e χ^2 para tendência = 9,751 $P = 0,0018$ GL = 1 $n = 78$ amostras tumorais; Ctrl – controle; GI, GII, GIII – grau histológico – São Paulo – 2014

Diferentemente dos marcadores anteriores, Ki67 apresentou diferença significativa na avaliação do comportamento de seu escore com a presença de metástase pulmonar e linfonodo comprometido, com média de escore de $11,31 \pm 7,70$ para o grupo portador de linfonodo comprometido e $13,35 \pm 1,06$ para o grupo portador de metástase pulmonar, com $P < 0,0001$ para 95% IC. Quando convertido em variável categórica, os escores de Ki67IP apresentaram-se todos positivos para animais portadores de metástase pulmonar (4/4) e quatro animais Ki67IP positivos em 7 portadores de linfonodo comprometido. O gráfico 28 apresenta a distribuição de Ki67IP em função da presença de metástase pulmonar e linfonodo positivo, após seus resultados serem submetidos ao teste de ANOVA.

Gráfico 28 - Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade de Ki67 em forma de variável contínua (porcentagem de células imunorreativas em relação ao total de células contadas), agrupados em função da presença de metástase pulmonar ou em linfonodo regional. Média do grupo controle (Ctrl) $2,08 \pm 3,51$ $P < 0,0001$ IC de 95% ANOVA. Na representação em boxplot, a caixa representa os percentis de 25 a 75%, a linha horizontal cheia representa a média do grupo, as barras horizontais os limites superior e inferior do intervalo de confiança; * refere diferença significativa no pós-teste de Dunnett de múltipla comparação entre o grupo Ctrl e o grupo marcado com o mesmo sinal; n = 28 animais; Ctrl – controle – São Paulo – 2014

Imunorreatividade de Ki67 vs metástase

Ki67 foi o marcador com melhor desempenho em relação ao estudo de sobrevida. A análise de log-rank para fração de sobrevida em função de Ki67 revelou diferença significativa entre os grupos, com $P = 0,0326$ ($X^2 = 4,57$ GL = 1) com média de sobrevida de $33 \pm 2,0$ meses para os animais com tumores negativos e $26 \pm 3,0$ meses para os animais tumores positivos (IC 95%). Também na análise de riscos de Cox houve significância para a marcação de Ki67 com HR = 3,29 para intervalo de confiança de 1,03 a 10,52 nos tumores positivos.

O gráfico 29 representa a curva de Kaplan-Meier de sobrevida em função da marcação por Ki67.

Gráfico 29 - Curva de Kaplan-Meier de probabilidade de sobrevida em função da imunorreatividade do marcador tumoral Ki67, considerando-se a data da mastectomia evento inicial e a morte por neoplasia mamária maligna evento final. Teste log-rank de Mantel-Cox: $P < 0,05$ $X^2 = 4,57$ GL 1; Fração de Risco (HR – hazard ratio) = 3,24 95% IC = 1,27 a 9,322. n = 61 animais – São Paulo – 2014

Finalizando os estudos individualizados dos marcadores tumorais, avaliou-se o comportamento de HER2 como variável categórica em função do tipo e grau histológico tumoral.

As figuras 7A, 7B e 7C exemplificam a marcação imunoistoquímica de HER2 em tecido mamário neoplásico. Notar que este marcador possui afinidade pela membrana celular e por esta razão, os pesquisadores denominam comumente este padrão de “favo de mel” ou colméia.

Considerando-se a imunorreatividade de HER2, houve diferença estatística significativa para a classificação por tipo histológico tumoral ($X^2 = 14,23$ $P = 0,0142$ GL 5), porém, não houve diferença para a distribuição dos escores de HER2 em função do grau histopatológico do tumor ($X^2 = 4,683$ $P = 0,1966$ GL 3). As tabelas 13 e 14 e os gráficos 30 e 31 sumarizam os dados obtidos nesta análise.

Figura 7 - Imagens fotográficas de padrões de imunorreatividade de HER2 de lâminas de corte histológico de tecido mamário neoplásico, obtidas com câmara digital acoplada à ocular de microscópio de luz. Magnitude equivalente a 400x – São Paulo – 2014

Figura 7A – Fotomicrografia de corte histológico de neoplasia mamária com estudo imunoistoquímico para HER2, obtida com microscópio óptico em campo de alta magnitude (400x) com escore 1 – marcação fraca de membrana em mais de 10% das células, em um adenoma complexo de grau I

Figura 7B – Fotomicrografia de corte histológico de neoplasia mamária com estudo imunoistoquímico para HER2, obtida com microscópio óptico em campo de alta magnitude (400x) com escore 2 – marcação moderada de membrana em mais de 10% das células, em um carcinoma simples tubular de grau I

Figura 7C – Fotomicrografia de corte histológico de neoplasia mamária com estudo imunoistoquímico para HER2 obtida com microscópio óptico em campo de alta magnitude (400x) com escore 3, - marcação forte de membrana em mais de 10% das células, em comedocarcinoma com áreas de padrão sólido de grau III

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental da FMVZ/USP

Fotomicrografias quando digitalizadas e manejadas por editores de texto perdem sua relação com a magnitude que originalmente a gerou. Por esta razão, não foi incluída barra de escala nas imagens

Tabela 13 - Frequência dos escores segundo tipo histológico do tumor e reação do marcador HER2 para teste do Qui-quadrado – São Paulo – 2014

Escore	Tipo histológico do tumor						Total
	Ctrl	Ca cplx	Ca mst	Ca spl	Ca tbp	Ca sld	
Negativo *	17 (100,0%)	12 (100,0%)	13 (92,9%)	19 (95,0%)	5 (83,3%)	5 (55,6%)	71 (91,0%)
Forte +	0 (0%)	0 (0%)	1 (7,1%)	1 (5,0%)	1 (16,7%)	4 (44,4%)	7 (9,0%)
Total	17 (21,8%)	12 (15,4%)	14 (17,9%)	20 (25,6%)	6 (7,7%)	9 (11,5%)	78

Ctrl – controle; Ca cplx – carcinoma complexo; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca tbp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido

* tumores com escore 0, 1 e 2 foram considerados negativos

Gráfico 30 - Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade de HER2 em forma de variável categórica (tumor positivo = escore 3+; tumor negativo = escores 2+, 1+ ou zero) e em função do tipo histológico tumoral. $\chi^2 = 14,23$ $P < 0,05$ GL 5 n = 78 amostras tumorais; Ctrl – controle; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca tbp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido – São Paulo – 2014

HER2 vs tipo histológico tumoral

Tabela 14 - Frequência dos escores segundo grau histológico do tumor e reação do marcador HER2 para teste do Qui-quadrado – São Paulo – 2014

Escore	Grau				Total
	Ctrl	GI	GII	GIII	
Negativo	17 (100,0%)	41 (95,3%)	10 (76,9%)	3 (60,0%)	64 (82,1%)
Forte +	0 (0%)	2 (4,7%)	3 (23,1%)	2 (40,0%)	7 (9,0%)
Total	17 (21,8%)	43 (55,1%)	13 (16,7%)	5 (6,4%)	78

Ctrl – controle, GI, GII, GIII – grau histológico 1, 2 e 3

* tumores com escore 0, 1 e 2 foram considerados negativos

Gráfico 31 - Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade de HER2 em forma de variável categórica (tumor positivo = escore 3+; tumor negativo = escores 2+, 1+ ou zero) e em função do grau histológico tumoral. $\chi^2 = 4,683$ $P > 0,05$ GL 3 n = 78 amostras tumorais; Ctrl – controle; GI, GII, GIII – grau histológico – São Paulo – 2014

Para o estudo de sobrevida em função da imunorreatividade de HER2 foi estabelecido o limite de corte para este marcador como positivo somente o tumor com marcação forte (3+), tendo em vista o maior número de modelos matemáticos com significância estatística quando da utilização da categorização de HER2 por este critério, particularmente no teste do Qui-quadrado para frequência de distribuição da imunorreatividade de HER2 em função do tipo e grau histológico

tumoral. A análise de log-rank para fração de sobrevida em função de HER2 não revelou diferença significativa entre os grupos, com $P = 0,2781$ ($X^2 = 1,17$ GL = 1) com média de sobrevida de $30,2 \pm 1,98$ meses com IC 95% para os animais com tumores negativos e de $24,7 \pm 5,8$ meses com IC 95% para os animais tumores positivos. O gráfico 32 apresenta a curva de Kaplan-Meier de sobrevida em função da marcação por HER2.

Gráfico 32 - Curva de Kaplan-Meier de probabilidade de sobrevida em função da imunorreatividade marcador tumoral HER2, considerando-se a data da mastectomia evento inicial e a morte por neoplasia mamária maligna evento final. Teste log-rank de Mantel-Cox: $P > 0,05$ $X^2 = 4,57$ GL 1; Fração de Risco (HR – hazard ratio) não significativa. n = 61 animais – São Paulo – 2014

Analisando os marcadores até então estudados, não houve diferença estatística nas médias dos escores de imunorreatividade de ER α e PR em função do estadiamento clínico, nas análises com os modelos de ANOVA e Kruskal-Wallis, no entanto, Ki67 apresentou diferença significativa neste último modelo ($P = 0,0342$). Também não houve diferença significativa na imunorreatividade categorizada e em função do estadiamento clínico no teste do Qui-quadrado para ER α , PR e HER2, a exceção de Ki67 ($X^2 = 14,65$ $P < 0,05$).

Em relação aos estudos de análise multivariada utilizando-se do modelo de riscos proporcionais de Cox, para a análise de ER α , PR, Ki67 e HER2 como covariáveis em relação à sobrevida, não houve significância para o modelo de ajuste global, com $P = 0,1907$ GL = 4. Apenas a covariável Ki67 apresentou, no modelo,

significância, com ($P = 0,0383$) e erro padrão (EP) menor que o coeficiente de regressão beta (b) e intervalo de confiança de 1,0814 a 13,4265, conforme quadro 10.

Quadro 10 - Análise de riscos proporcionais de Cox (método “enter”) para ERα, PR, Ki67 E HER2 como covariáveis – São Paulo – 2014

Covariável	b	EP	P	Exp(b)	95% IC de Exp(b)
ERα = negativo	0,2302	0,6898	0,7386	1,2588	0,3280 a 4,8318
PR = negativo	0,8920	0,8704	0,3054	2,4401	0,4469 a 13,3220
HER2 = positivo	0,05456	0,7376	0,9410	1,0561	0,2506 a 4,4502
Ki67 = positivo	1,3377	0,6459	0,0383	3,8104	1,0814 a 13,4265

b = coeficiente de regressão beta

EP – erro padrão

Exp(b) = exponencial de beta

Com base nas classificações moleculares dos tumores mamários deste estudo, avaliou-se a frequência de cada subtipo tumoral em função do tipo e grau histológicos dos tumores.

As tabelas 15 e 16 apresentam a distribuição dos diferentes subtipos e sua ocorrência em cada tipo histológico. Não houve diferença estatística significativa na distribuição dos subtipos em função do diagnóstico histológico para ambas as classificações no teste do Qui-quadrado.

Em ambas as classificações houve predomínio do tipo luminal A (83,6% na classificação CMSa e 55,7% para CMGs), com maior frequência de ocorrência nos tipos histológicos carcinoma complexo, misto e simples. No entanto, na classificação CMGs houve importante representação do subtipo luminal B, categorizado em luminal B HER negativo (27,9%).

Tabela 15 - Frequência dos tumores malignos por tipo histológico e subtipo molecular segundo classificação CMSa para teste do Qui-quadrado. n = 61 – São Paulo – 2014

Subtipo	Tipo histológico					Total
	Ca cpls	Ca mst	Ca spl	Ca tbp	Ca sld	
HER2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (11,0%)	1 (1,6%)
luminal A	12 (100,0%)	12 (85,7%)	19 (95,0%)	4 (66,7%)	4 (44,4%)	51 (83,6%)
luminal B	0 (0%)	1 (7,1%)	1 (5,0%)	1 (16,7%)	3 (33,3%)	6 (9,8%)
triplo negativo	0 (0%)	1 (7,1%)	0 (0%)	1 (33,3%)	1 (11,1%)	3 (4,9%)
Total	12 (19,7%)	14 (23,0%)	20 (32,8%)	6 (9,8%)	9 (14,8%)	61

Ctrl – controle; Ca cplx – carcinoma complexo; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca tbp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido

Tabela 16 - Tabela de frequência dos tumores malignos segundo tipo histológico e classificação molecular segundo classificação CMGs para teste do Qui-quadrado. N = 61 – São Paulo – 2014

Subtipo	Tipo histológico					Total
	Ca cpls	Ca mst	Ca spl	Ca tbp	Ca sld	
HER2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (11,0%)	1 (1,6%)
Luminal A	7 (58,3%)	7 (50,0%)	14 (70,0%)	2 (33,3%)	4 (44,4%)	34 (55,7%)
Luminal B HER-	5 (41,7%)	5 (35,7%)	5 (25,0%)	2 (33,3%)	0 (0%)	17 (27,9%)
Luminal B HER+	0 (0%)	1 (7,1%)	1 (5,0%)	1 (16,7%)	3 (33,3%)	6 (9,8%)
triplo negativo	0 (0%)	1 (7,1%)	0 (0%)	1 (16,7%)	1 (11,0%)	3 (4,9%)
Total	12 (19,7%)	14 (23,0%)	20 (32,8%)	6 (9,8%)	9 (14,8%)	61 (100,0%)

Ctrl – controle; Ca cplx – carcinoma complexo; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca tbp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido

Quando em função do grau, CMSa apresentou predomínio da ocorrência do tipo luminal nos tumores de grau I (91,0%), ao passo que esta distribuição foi mais homogênea na classificação CMGs tanto em função do subtipo quanto do grau, conforme tabelas 17 e 18.

Tabela 17 - Frequência dos tumores malignos por grau histológico e subtipo molecular segundo classificação CMSa para teste do Qui-quadrado. n = 61 – São Paulo – 2014

Subtipo	Grau histológico			Total
	GI	GII	GIII	
HER2	0 (0%)	0 (0%)	1 (20,0%)	1 (1,6%)
Luminal A	39 (91,0%)	10 (77,0%)	2 (40,0%)	51 (83,6%)
Luminal B	2 (5,0%)	3 (23,0%)	1 (20,0%)	6 (9,8%)
triplo negativo	2 (5,0%)	0 (0%)	1 (20,0%)	3 (4,9%)
Total	43 (70,5%)	13 (21,3%)	5 (8,2%)	61

Ctrl – controle, GI, GII, GIII – grau histológico 1, 2 e 3

Tabela 18 - Frequência dos tumores malignos segundo grau histológico e classificação molecular segundo classificação proposta por CMGs para teste do Qui-quadrado. n = 61 – São Paulo – 2014

Subtipo	Grau histológico			Total
	GI	GII	GIII	
	0 (0%)	0 (0%)	1 (20,0%)	1 (1,6%)
HER2	26 (60,0%)	6 (46,0%)	2 (40,0%)	34 (55,7%)
Luminal A	13 (30,0%)	4 (31,0%)	0 (0%)	17 (27,9%)
Luminal B HER-	2 (5,0%)	3 (23,0%)	1 (20,0%)	6 (9,8%)
Luminal B HER+	2 (5,0%)	0 (0%)	1 (20,0%)	3 (4,9%)
triplo negativo				
Total	43 (70,5%)	13 (21,3%)	5 (8,2%)	61

Ctrl – controle, GI, GII, GIII – grau histológico 1, 2 e 3

A análise de sobrevida em função da classificação CMSa pelo método de log-rank obteve-se diferença altamente significativa entre os grupos com $P = 0,0033$ para IC 95%IC ($X^2 = 13,71$ GL = 3) com médias de sobrevida de $6,0 \pm 0,0$ meses para animais classificados como HER2; $16,3 \pm 3,8$ meses para animais “triplo negativo”, $27,8 \pm 5,9$ meses para animais “luminal B” e $30,7 \pm 2,0$ meses para animais “luminal A”, conforme curvas de sobrevida ilustradas no gráfico 33 .

Gráfico 33 - Curva de Kaplan-Meier de probabilidade de sobrevida em função da classificação molecular dos tumores com base na proposta de Sassi et al (2010) - CMSa, considerando-se a data da mastectomia evento inicial e a morte por neoplasia mamária maligna evento final. Teste log-rank de Mantel-Cox: $P < 0,05$ n = 61 animais – São Paulo – 2014

Classificação molecular dos tumores CMSa

Na mesma análise imposta à classificação proposta por Goldhirsch et al. (2011) - CMGs, obteve-se também diferença altamente significativa entre os grupos, com $P = 0,0082$ para IC 95% ($X^2 = 13,72$ GL = 3) e as mesmas médias de sobrevida ($6,0 \pm 0,0$ meses) para animais classificados como HER2 e $16,3 \pm 3,8$ meses para animais “triplo negativo”. Para animais “luminal A” obteve-se a média de sobrevida de $30,6 \pm 2,4$ meses e média de sobrevida de $26,3 \pm 2,8$ meses para animais “luminal B HER2 negativo, enquanto a média de sobrevida para animais “luminal B HER2 positivo foi de $27,8 \pm 5,8$ meses, conforme ilustra o gráfico 34.

Gráfico 34 - Curva de Kaplan-Meier de probabilidade de sobrevida em função da classificação molecular dos tumores com base na proposta de Goldhirsch et al. (2011), considerando-se a data da mastectomia evento inicial e a morte por neoplasia mamária maligna evento final. Teste log-rank de Mantel-Cox: $P < 0,05$ $n = 61$ animais – São Paulo – 2014

Classificação molecular dos tumores CMGs

Contudo, considerando-se a análise multivariada destes marcadores quando os tumores foram agrupados em subtipos moleculares e sob a influência das variáveis grau histológico do tumor e estadiamento, obteve-se na classificação proposta por Sassi et al. (2010) como covariável, significância para o modelo geral de ajuste ($P = 0,0001$) e para as covariáveis “luminal B”, estágio 5 e grau histológico III, conforme sumarizado no quadro 11. Da mesma forma, na classificação proposta por Goldhirsch et al. (2011) como covariável, obteve-se significância para o modelo geral de ajuste ($P = 0,0001$) e para as covariáveis “luminal B HER2+”, estágio 5 e

grau histológico III, tanto para limite de corte de Ki67 de 10%, utilizado neste estudo, quanto com o limite de corte originalmente proposto pelo autor, de 14% para positividade do tumor para imunorreatividade de Ki67 (dados não inclusos). Os quadros 11 e 12 sumarizam a análise multivariada de Cox para ambas as classificações.

Quadro 11 - Análise de riscos proporcionais de Cox (método “forward”) para os subtipos moleculares segundo classificação CMSa – São Paulo – 2014

Covariável	b	EP	P	Exp(b)	95% IC de Exp(b)
luminal B	-4,4102	1,7767	0,0131	0,0122	0,0004 a 0,3885
Estádio = 5	7,0392	1,7378	0,0001	1140,44	38,49 a 33789,25
Grau = III	2,5496	1,1337	0,0245	12,80	1,403 a 116,79

b = coeficiente de regressão beta

EP – erro padrão

Exp(b) = exponencial de beta

Quadro 12 - Análise de riscos proporcionais de Cox (método “forward”) para os subtipos moleculares segundo classificação CMGs – São Paulo – 2014

Covariável	B	EP	P	Exp(b)	95% IC de Exp(b)
Luminal B HER+	-4,4042	1,7757	0,0131	0,0122	0,0004 to 0,390
Estádio = 5	7,0231	1,7537	0,0001	1122,28	36,72 to 34299,66
Grau = III	2,5407	1,1388	0,0257	12,68	1,377 to 116,88

b = coeficiente de regressão beta

EP – erro padrão

Exp(b) = exponencial de beta

3.5 DISCUSSÃO

A busca por marcadores tumorais que aumentem a capacidade de previsão do curso da doença neoplásica maligna e de sua resposta à terapia é uma constante na Medicina e na Medicina Veterinária. Infelizmente, o marcador ideal, capaz de ser detectado facilmente nos líquidos corporais, não ser detectável em pacientes saudáveis, permitir diagnóstico precoce, ser alvo-específico, auxiliar na escolha da terapia mais adequada e auxiliar na monitoração do tratamento e, finalmente, ter metodologia diagnóstica de baixo custo e fácil execução, ainda não existe. Talvez a mensuração do antígeno prostático específico – PSA (*Prostate Specific Antigen*) seja o marcador que mais se aproxime das condições ideais na espécie humana.

Em Medicina Veterinária também são objeto de estudo, marcadores consagrados na Medicina, ora com resultados promissores, ora com resultados de pouca utilidade.

O propósito deste estudo foi estudar marcadores tumorais consagrados em Medicina e Medicina Veterinária: receptor de estrógeno e progesterona, protooncogene HER2 e marcador de proliferação celular Ki67, em animais provenientes da região da Baixada Santista, avaliando seu desempenho na classificação molecular dos tumores mamários e sua aplicação na avaliação de sobrevida e prognóstico.

De modo geral, os achados epidemiológicos da população estudada acompanharam relatos anteriormente publicados.

A idade média ao diagnóstico da doença mamária neoplásica, de 10,15 anos para a população estudada, um importante fator de risco para esta doença, está de acordo com relatos anteriores, de 9,5 anos para animais portadores de neoplasias malignas e 8,5 anos para animais portadores de neoplasias mamárias benignas e de acordo, também, com os dados obtidos em estudo retrospectivo da população canina da mesma região, sugerindo um longo período necessário da transformação maligna à detecção clínica da doença. Também o limite inferior de 5,1 anos de idade está de acordo com limite estabelecido na literatura para animais que não sofreram tratamento hormonal prévio (CASSALI et al., 2011; SLEECKX et al., 2011; SORENMO et al., 2011).

Outro importante fator de risco recai sobre o estado reprodutivo da paciente e a idade em que a mesma foi submetida à castração. Na população em estudo, apenas 24,3% dos animais (17/70) haviam sido esterilizados antes do diagnóstico da doença mamária, com média de idade à castração elevada, em torno de 8 anos de idade, com os animais não castrados apresentando maior expressão de receptores de estrógeno e progesterona em relação aos animais castrados. Sabe-se que os hormônios sexuais são necessários para o desenvolvimento das glândulas mamárias e tanto estrógeno como progesterona aumentam a fração de crescimento e induzem a proliferação epitelial desta glândula. Um maior tempo de exposição a estes hormônios poderia, portanto, resultar no acúmulo de mutações espontâneas favoráveis ao fenótipo neoplásico. Particularmente o estrógeno, por seu efeito proliferativo e indutor de mitoses no epitélio glandular, poderia aumentar as

condições favoráveis à transformação maligna (SORENMO; SHOFER; GOLDSCHMIDT, 2000; TODOROVA, 2006).

Também a heterogênea distribuição dos animais nas diferentes raças está de acordo com a literatura e com dados previamente descritos para a região em estudo, que demonstrou maior risco para animais de algumas raças puras, fato este corroborado por Sleeckx et al. (2011) que apontou maior incidência da doença em raças como poodle e cocker spaniel inglês, embora a doença possa ocorrer em fêmeas de qualquer raça e alguns estudos tendam a superestimar a incidência das raças miniaturas, num claro viés causado pela região em estudo (SORENMO et al., 2011).

Contudo, os dados epidemiológicos de maior importância recaem sobre a distribuição das neoplasias em grau de malignidade e a sobrevida das pacientes em função do estágio clínico, diagnóstico histopatológico e grau histológico dos tumores.

Na população estudada, verifica-se importante prevalência de neoplasias de caráter maligno, que corresponderam a mais 87% dos tumores estudados, dado semelhante ao obtido no estudo retrospectivo da região da Baixada Santista e que, embora acima da média relatada na literatura de 30 a 50%, está próxima aos limites de ocorrência descritos por diferentes autores, de 23 a 73% de incidência (SORENMO, 2003; MUNSON; MORESCO, 2007; OLIVEIRA FILHO et al., 2010).

Nos estudos de sobrevida em função do estadiamento e do grau histológico tumoral, obteve-se resultado semelhante à literatura que aponta pior prognóstico para grau histológico e estádios mais elevados. Contudo, à semelhança dos resultados obtidos no estudo retrospectivo, não foi encontrada diferença estática na sobrevida em função do tipo histológico, em desacordo com outros relatos. No entanto, alguns relatos incluíram em suas amostras carcinomas anaplásicos, que possuem média de sobrevida muito baixa, em torno de 2,5 meses em comparação à sobrevida dos demais tipos histológicos, que apresentam médias em torno de 14 a 21 meses. A ausência de neoplasias de caráter muito agressivo na população estudada pode, portanto, ter influenciado os cálculos de sobrevida (YAMAGAMI et al., 1996; PEREZ ALENZA et al., 2000; CHANG et al., 2005; KARAYANNOPOULUS; KALDRYMIDOU; CONSTANTINIDIS, 2005; CASSALI et al., 2011; GOLDSCHMIDT et al., 2011; SLEECKX et al., 2011; SORENMO et al., 2011).

Dos estudos realizados com os marcadores, não foi observada correlação linear entre os escores de ER α , PR e Ki67 assim como não se observou

interdependência entre as mesmas na análise de riscos de Cox, neste caso em função também associando a marcação de HER2, denotando, neste trabalho, independência do comportamento destes marcadores na biologia tumoral.

O melhor desempenho da expressão dos receptores esteróides foi observado na média dos escores da imunorreatividade de ER α , que acompanhou tanto o tipo histológico tumoral quanto o grau histológico, com diminuição progressiva e sucessiva entre os fragmentos controle (LENN – adenose, hiperplasia tubular e tumores benignos), carcinomas complexos, carcinomas mistos, carcinomas tubulares simples, carcinomas túbulo-papilíferos e carcinomas sólidos, assim como em função do grau histológico, numa crescente diminuição da imunorreatividade de ER α do grau I para o grau III.

Particularmente em relação aos tipos especiais de carcinoma presentes no grupo, *comedocarcinoma* e *carcinoma inflamatório*, a expressão de ER α em ambos (escores 8,5 e 5,1 respectivamente) apresentou-se bastante baixa em relação à média do grupo controle, de 47,11. Estas observações não se repetiram para a imunorreatividade de PR, tanto em função do tipo e grau histológico quanto em função dos tipos especiais de carcinomas, onde a expressão de PR apresentou-se baixa no comedocarcinoma (9,1), porém, em nível comparado aos mais altos das lesões normais, para o carcinoma inflamatório (98,0).

Quando categorizada, a expressão de ER α e PR apresentaram comportamento semelhante, com menor expressão nos carcinomas sólidos e nos tumores de Grau III.

Estes dados corroboram os relatos que associam a perda progressiva de expressão dos receptores de estrógeno aos fenótipos tumorais mais agressivos, fato que se repetiu quando os tumores foram classificados em função do limite de corte e transformados em variável categórica, com pontuação positiva ou negativa (SORENMO et al., 2003; MILLANTA et al., 2005; ILLERA et al., 2006; AMORIM et al., 2007; CHANG et al., 2009) No entanto, contrapõem-se aos relatos de Sartin et al. (1992) e Toniti et al. (2009) que não encontraram relação entre a expressão dos receptores de estrógeno e progesterona, com o tipo histológico tumoral.

Contudo, a avaliação da sobrevida em função da expressão de ER α e PR não demonstraram diferença entre os animais positivos e negativos no modelo de Kaplan-Meier e log-rank no grupo estudado, assim como não houve relação entre os escores de ER α e PR e a presença de invasão, seja ela pulmonar ou linfática. Estes

dados conflitam com a literatura onde níveis significativamente baixos de expressão de ER α foram detectados em tumores de animais portadores de metástase e onde tumores ER α e PR positivos foram associados ao maior período livre da doença (SARTIN et al., 1992; NIETO et al., 2000; DE LAS MULAS; MILLÁN; DIOS, 2005). Contudo, estas observações estão em concordância com os achados de Millanta et al. (2005) que não encontraram relação na expressão de ER α e PR com tipo histológico tumoral ou com sobrevida.

Na verdade, são poucos os trabalhos que tentam relacionar a expressão dos receptores esteróides com sobrevida e, de modo geral, são contraditórios. Esta tentativa de associação pode estar relacionada ao comportamento destes receptores na doença mamária em humanos. Na mulher, a expressão de ER e PR são consideradas fatores prognósticos e preditivos para o uso de terapia endócrina e níveis de expressão tão baixos como 1% de imunomarcção podem ser considerados limite de corte confiável para que o tumor seja considerado positivo e a terapia hormonal instituída. No entanto, a prática de esterilização das fêmeas caninas concomitantemente ao ato cirúrgico de exérese da cadeia mamária comprometida, torna a indicação da terapia hormonal de pouca utilidade em Medicina Veterinária (HAMMOND et al., 2010; PEÑA et al., 2013).

A presença de dez animais portadores de tumores com imunorreatividade positiva para PR e negativa para ER α foi um aspecto importante observado neste estudo. Sabe-se que a expressão do receptor de progesterona na mulher é mediada pelo receptor de estrógeno e sua positividade é considerada um marcador de funcionamento dos receptores de estrógeno. Nas mulheres, este padrão ER α negativo e PR positivo ocorrem em aproximadamente 10% dos tumores testados para ER e PR e parece estar associado a pior prognóstico e ao comportamento intermediário entre os tumores ER+ PR+ e ER- PR- (ZUCCARI et al., 2008; CHANG et al., 2009; HONG NG et al., 2012).

Por outro lado, ambos os marcadores de receptor esteróide apresentaram diminuição de sua expressão nos animais castrados previamente ao diagnóstico da doença mamária neoplásica, fato que deve ser levado em conta quando da interpretação do resultado em animais portadores de tumores ER e/ou PR negativos.

Na população em estudo, a imunorreatividade de Ki67 demonstrou comportamento semelhante ao marcador ER α em relação ao tipo histológico tumoral, tendendo a apresentar valores mais elevados em função dos tipos

histológicos mais agressivos e em função do grau histológico do tumor, estando em concordância com relatos anteriores (ZUCCARI et al., 2008; BADOWSKA-KOZAKIEWICZ, 2012). No entanto, a frequência de ocorrência de Ki67 como variável categórica não demonstrou distribuição homogênea, embora com significância estatística.

O resultado de maior relevância para este marcador, no entanto, recai sobre a sobrevida em função de sua marcação. Houve significância estatística nos modelos de sobrevida em função da marcação mais forte de Ki67, com aproximadamente 75% de probabilidade dos animais positivos morrerem antes dos animais negativos (HR 3,24; limite inferior do intervalo de confiança > 1,0) e significância estatística na média de imunorreatividade de Ki67 nos animais portadores de metástase pulmonar e linfonodos positivos. Estas observações corroboram relatos anteriores (PEÑA et al., 1998; AMORIM et al., 2008; ZUCCARI et al., 2008). Em relato recente, Santos et al. (2013), estudando a marcação de Ki67 (MIB-1) em tumores de 85 animais portadores de neoplasia mamária maligna, observaram diferença significativa na sobrevida e no período livre da doença nos animais com escores mais altos deste marcador, considerado pelos autores como fator prognóstico independente nos tumores mamários caninos.

A marcação imunoistoquímica de HER2 também mostrou relação com o tipo histológico do tumor, porém, não guardou correlação com o grau histológico. Porém, embora não tenha havido diferença estatisticamente significativa, este marcador acompanhou uma escala de marcação crescente e linear de 0% nos tumores benignos a 40% dos tumores Grau III positivos. Tendo em vista que a ativação do receptor do fator de crescimento epidérmico 2 leva à ativação das vias de proliferação e ciclo celular, e que os parâmetros para determinação do grau levam em conta figuras de mitose e pleomorfismo, fatos associados ao crescimento celular e observados em tumores HER2 positivos, é justificável que a superexpressão de HER2/*neu* esteja associada ao grau tumoral, ainda que esta observação não tenha sido comprovada neste trabalho (DUTRA et al., 2004; MUHAMMADNEJAD et al., 2012)

Também a marcação positiva para HER2 associou-se aos tipos especiais de carcinoma deste grupo de estudo (comedocarcinoma e carcinoma inflamatório, ambos marcados positivamente) e parcialmente com metástase pulmonar (1 em 4 animais) e invasão linfática (1 em 7 animais).

Neste relato apenas 9% dos tumores malignos em estudo apresentaram marcação positiva para HER2 e total ausência de marcação nos tumores benignos. Estes resultados, embora semelhantes em função da associação da marcação de HER2 e o grau histológico, contrapõe-se aos resultados obtidos por Rungsipipat et al. (1999) e Dutra et al. (2004) que encontraram índices de marcação de HER2 bastante altos nos tumores malignos (19,1% e 35,3% respectivamente) e benignos (50% no trabalho de RUNGSIPIPAT et al., 1999), estando mais próximos dos relatos de De las Mulas et al. (2003) e Gama, Alves e Schmitt (2008) que obtiveram resultados próximos a 20% de marcação positiva nos carcinomas mamários na cadela. Estas diferenças provavelmente ocorreram em razão da metodologia utilizada por estes autores, que consideraram positivos tumores de escore 2+. De fato, Peña et al. (2013) alertam para a grande variabilidade dos relatos da expressão de HER2 em tumores mamários caninos, variando de 17,6 a 48% em diferentes estudos e alertam para a necessidade de padronização da metodologia e considerar positivos somente os tumores com escore 3+ para HER2.

HER2 como fator prognóstico para sobrevida, no entanto, não demonstrou valor clínico no grupo em estudo, pois, apesar da curva de Kaplan-Meier apresentar resultado menos favorável aos animais positivos, não houve diferença estatística entre os grupos. Neste sentido, parece não haver consenso, entre os autores que também estudaram a expressão de HER2 em neoplasias mamárias caninas. De fato, Ressel et al. (2012) estudaram a correlação em tecidos mamários normais, hiperplásicos, adenomas e carcinomas caninos entre grau tumoral, índice mitótico, invasão linfática e sobrevida e observaram correlação entre os carcinomas positivos para HER2 apenas com o índice mitótico. Este grupo também identificou em tecidos perimamários normais, hiperplásicos e displásicos forte marcação para HER2, fato não observado neste trabalho, o que, segundo estes autores, tornaria este marcador inadequado na identificação de subgrupos tumorais de pior prognóstico, a exemplo do que ocorre na mulher.

O comportamento de HER2 observado neste trabalho também se contrapõem ao relato de Hsu et al. (2007), que avaliaram a marcação de HER2 em fêmeas portadoras de tumores mamários malignos submetidas à mastectomia e observaram melhor taxa de sobrevida para as fêmeas cujos tumores superexpressavam este marcador. Segundo os autores, a explicação desta observação contrária poderia estar no comportamento deste marcador nos tumores humanos, onde a deleção do

éxon 16 e polimorfismo do códon 655 estão presentes, alterações estas não encontradas nos tumores caninos.

Resta a questão, portanto, se marcadores com comportamentos distintos aos observados em outros relatos e na mulher, podem ser utilizados como ferramenta de busca por subtipos tumorais de pior prognóstico, para os quais os meios prognósticos de uso corrente na clínica como tipo e grau histológico e estadiamento clínico não seriam capazes de detectar.

Quando estudados em conjunto, ER α , PR, Ki67 e HER2 na análise multivariada de sobrevida, utilizando-se do modelo de riscos proporcionais de Cox, apenas o marcador Ki67 manteve significância estatística na previsão de sobrevida, indicando independência aos demais marcadores.

Avaliando o desempenho das classificações por subtipo molecular utilizadas por Sassi et al. (2010) – CMSa e por Goldschmidt et al. (2011) – CMGs, foi possível observar neste estudo, que a distribuição dos subtipos tumorais obedece a certa lógica em ambas as classificações, onde subtipos considerados mais agressivos na mulher, apresentaram maior frequência em função dos tipos histológicos mais agressivos ou de grau histológicos mais altos. Assim, com maior frequência do subtipo luminal A e com os carcinomas sólidos e túbulo-papilíferos predominando nos subtipos luminal B HER+ e triplo negativo, este trabalho assemelha-se aos resultados obtidos por Im et al. (2013).

Quando comparadas na distribuição geral dos subtipos, a classificação CMSa apresentou 83,6% animais com seus tumores classificados como luminal A e 9,8% luminal B, enquanto na classificação CMGs 55,5% foram classificados como luminal A e 37,7% em luminal B HER- e luminal B HER+. Estes últimos resultados estão mais próximos daqueles obtidos por Gama, Alves e Schmitt (2008), que observaram 44,0% de tumores luminais A e de Ribeiro et al. (2012) que observaram 41,4% de carcinomas mistos subclassificados como luminais A, porém se contrapõe ao relato de Sassi et al. (2010) que observaram 48% de tumores luminais B e apenas 29% de tumores subtipo luminal A, alertando para as diferenças encontradas na mulher. No entanto, estes autores trabalharam com amostras menores, em torno de 35 animais, o que poderia explicar a diferença entre seu relato e este trabalho.

Contudo, diferentemente do objetivo dos autores ora citados, que buscaram relacionar o subtipo molecular menos favorável ao tipo histológico tumoral mais agressivo, este trabalho objetivou estudar a capacidade das classificações

moleculares em detectar dentre os tumores mamários caninos, subtipos tumorais mais agressivos e que receberam diagnóstico histopatológico ou gradação tumoral mais favoráveis, pois, entende-se que esta seja a real motivação da utilização das subclassificações.

Ambas as classificações demonstraram capacidade de detectar subtipos importantes como luminal B e triplo negativo dentre os carcinomas mistos, porém, a classificação CMGs foi mais sensível ao detectar subtipos considerados menos favoráveis entre os carcinomas complexos, ou dentre os tumores de grau histológico mais baixos como Grau I e II, ao reclassificar os tumores luminais A com base em sua marcação por Ki67. De fato, Ribeiro et al. (2012), estudando os carcinomas mistos em tumor benigno (CMTB), alertaram para o fato de apesar dos CMTB apresentarem indicativos de baixa malignidade, como baixo grau histológico e baixo índice mitótico, representam um grupo heterogêneo com diferentes perfis imunofenotípicos.

Embora as curvas de Kaplan-Meier e a análise de sobrevida em ambas as classificações tenham, neste trabalho, demonstrado significância estatística, os resultados obtidos no modelo de ajuste global na análise de sobrevida de Cox para ambas as classificações apontaram que as covariáveis de maior peso restringiram-se aos tumores luminal B (CMSa) e luminal B HER positivo (CMGs), estágio V e grau histológico III, porém, apenas o estadiamento clínico e o grau histológico apresentaram erro padrão (EP) menor que beta (b), invalidando as demais covariáveis, a exemplo do relato de Sassi et al. (2010).

3.6 CONCLUSÕES

A prevalência dos tumores mamários em cães e a semelhança que a doença na espécie canina guarda com a doença neoplásica em humanos justificam estudos de marcadores tumorais que possuam valor prognóstico ou que permitam a melhor compreensão dos mecanismos genéticos envolvidos na doença.

De modo isolado, apenas Ki67 demonstrou, neste estudo, maior correlação com os tipos e graus histológicos e demonstrou-se fator prognóstico independente para sobrevida.

No entanto, a utilização destes marcadores na forma categórica, classificando os animais em positivos e negativos, mostrou-se útil no estudo dos tumores, uma vez que, à exceção de HER2 os demais marcadores apresentaram diferença significativa entre os animais agrupados tanto em função do tipo histológico quanto de seu grau.

Por outro lado, a subclassificação dos tumores utilizada por Goldhirsch et al. (2011) mostrou-se ferramenta útil na detecção de subtipos tumorais mais agressivos dentre os tipos histológicos considerados na prática clínica mais favoráveis.

Neste sentido, ainda não tenha se mostrado como ferramenta útil na determinação do prognóstico, possivelmente pela limitação imposta pela frequência de distribuição heterogênea dos diferentes tipos histológicos na população estudada, esta classificação molecular poderá ser utilizada na prática clínica como ferramenta adicional ao diagnóstico histopatológico de rotina ou na utilização do cão como modelo natural para estudos das neoplasias mamárias humanas.

Futuros trabalhos poderão indicar, também, a utilidade da classificação molecular proposta por Goldhirsch et al. (2011) como fator preditivo de terapêutica individualizada.

REFERÊNCIAS

AMORIM, R. L.; SOUZA, C. H. M.; BANDARRA, E. P.; SANCHES, O. D. C.; PIZA, E. D. T. Immunohistochemical study of estrogen and progesterone receptors and cell proliferative indexes in canine inflammatory mammary carcinoma : 9 cases. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 1, n. 1, p. 16–20, 2008.

BADOWSKA-KOZAKIEWICZ, A. M. Prospective study of tumor markers as prognostic factors in the histopathological differential diagnosis of mammary gland neoplasms in female canines. In: PERES-MARIN, C. C. (Ed.). **A birds's eyeview of veterinary medicine**. 2012. cap. 12, p. 199-230. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/a-birds-s-eye-view-o-veterinary-medicine/prospective-study-of-tumor-markers-as-prognostic-factors-in-the-histopathological-differential-diagn>> Acesso em: 07 jan. 2014.

BUISHAND, F. O.; KIK, M.; KIRPENSTEIJN, J. Evaluation of clinico-pathological criteria and the ki67 index as a prognostic indicators in canine insulinoma. **The Veterinary Journal**, v. 185, p. 62-67, 2010

CASSALI, G. D.; LAVALLE, G. E.; DE NARDI, A. B.; FERREIRA, E.; BERTAGNOLLI, A. C.; ESTRELA-LIMA, A.; ALESSI, A. C.; DALECK, C. R.; SALGADO, B. S.; FERNANDES, C. G.; SOBRAL, R. A.; AMORIM, R. L.; GAMBA, C. O.; DAMASCENO, K. A.; AULER, P. A.; MAGALHÃES, G. M.; SILVA, J. O.; RAPOSO, J. B.; FERREIRA, A. M. R.; OLIVEIRA, L. O.; MALM, C.; ZUCCARI, D. A. P. C.; TANAKA, N. M.; RIBEIRO, L. R.; CAMPOS, L. C.; SOUZA, C. M.; LEITE, J. S.; SOARES, L. M. C.; CAVALCANTI, M. F.; FONTELES, Z. G. C.; SCHUCH, I. D.; PANIAGO, J.; OLIVEIRA, T. S.; TERRA, E. M.; CASTANHEIRA, T. L. L.; FELIX, A. O. C.; CARVALHO, G. D.; GUIM, T. N.; GUIM, T. N.; GARRIDO, E.; FERNANDES, S. C.; MAIA, F. C. L.; DAGLI, M. L. Z.; ROCHA, N. S.; FUKUMASU, H.; GRANDI, F.; MACHADO, J. P.; SILVA, S. M. M. S.; BEZERRE, J. E.; FREHSE, M. S.; PAES DE ALMEIDA, E. C.; CAMPUS, C. B. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 4, p. 153-180, 2011.

CHANG, C. C.; TSAI, M. H.; LIAO, J. W.; CHAN, J. P. W.; WONG, M. L.; CHANG, S. C. Evaluation of hormone receptor expression use in predicting survival of female dogs with malignant mammary gland tumors. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 235, p. 391-396, 2009.

CHANG, S. C.; CHANG, C. C.; CHANG, T. J.; WONG, M. L. Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumours, p. 79 cases (1998-2002). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 227, p. 1625-1629, 2005.

COLODEL, M. M. Spontaneous mammary carcinomas in female dogs: association between immunohistochemical degrees of neoplasia aggressiveness and residual pyrethroids. **Open Journal of Veterinary Medicine**, v. 02, n. 04, p. 207–215, 2012.

CORONATO, S.; LAGUENS, G. E.; SPINELLI, O. M.; DI GIROLAMO, W.
Marcadores Tumorales em Cancer de Mama. **Medicina**, v. 62, p. 73-82, 2002.

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

DARB-ESFAHANI, S.; LOIBL, S.; MÜLLER, B. M.; ROLLER, M.; DENKERT, C.; KOMOR, M.; SCHLÜNS, K.; BLOHMER, J. U.; BUDCZIES, J.; GERBER, B.; NOSKE, A.; DU BOIS, A.; WEICHERT, W.; JACKISCH, C.; DIETEL, M.; RICHTER, K.; KAUFMANN, M.; VON MINCKWITZ, G. Identification of biology-based breast cancer types with distinct predictive and prognostic features: role of steroid hormone and HER2 receptor expression in patients treated with neoadjuvant anthracycline/taxane-based chemotherapy. **Breast Cancer Research**, v. 11, n. 5, R69, 2009.

DE LAS MULAS, J. M.; MILLÁN, Y.; DIOS, R. A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor alpha and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 2, p. 200–12, 2005.

DOWSETT, M.; NIELSEN, T. O.; A'HERN, R.; BARLETT, J.; COOMBES, R. C.; CUZICK, J.; ELLIS, M.; HENRY, N. L.; HUGH, J. C.; LIVELY, T.; MCSHANE, L.; PAIK, S.; PENAULT-LLORCA, F.; PRUDKIN, L.; REGAN, M.; SATER, J.; SOTIRIOU, C.; SMITH, I. E.; VIALE, G.; ZUJEWSKI, J. A.; HAYES, D. F. Assessment of Ki67 in breast cancer: Recommendations from the international ki67 in breast cancer working group. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 103, p. 1-9, 2011.

DUTRA, A. P.; GRANJA, N. V. M.; SCHMITT, F. C.; CASSALI, G. D. c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 11, p. 1673-1681, 2004.

EISEMBERG, A. L. A.; KOIFMAN, S. Câncer de mama: marcadores tumorais (revisão de literatura). **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 4, p. 377-388, 2001.

ESTEVA, F. J.; CHELI, C. D.; FRITSCH, H.; FORNIER, M.; SIAMON, D.; THIEL, R. P.; LUFTNER, D.; GHANI, F. Clinical utility of serum HER2/neu in monitoring and prediction of progression-free survival in metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab-based therapies. **Breast Cancer Research**, v. 7, n. 4, R436-R443, 2005.

FASCHING, P. A.; HEUSINGER, K.; HAEBERLE, L.; NIKLOS, M.; HEIN, A.; BAYER, C. M.; RAUH, C.; SCHULZ-WENDTLAND, R.; BANI, M. R.; SCHRAUDER, M.; KAHMANN, L.; LUX, M. P.; STREHL, J. D.; HARTMAN, A.; DIMMLER, A.; BEXKMANN, M. W.; WACHTER, D. L. Ki67, chemotherapy response, and prognosis in breast cancer patients receiving neoadjuvant treatment. **Breast Journal**, v. 11, p. 486, 2011. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/11/486>> Acesso em: 25 out. 2013.

FERGUSON, N. L.; BELL, J.; HEIDEL, R.; LEE, LEE, S.; VANMETER, S.; DUNCAN, L.; MUNSEY, B.; PANELLA, T.; ORUCEVIC, A. Prognostic value of breast cancer subtypes , ki-67 proliferation index , age , and pathologic tumor caucasian women. **Breast Journal**, v. 19, n. 1, p. 22–30, 2013.

GAMA, A.; ALVES, A.; SCHMITT, F. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. **Virchows Archives**, v. 453, p. 123-132, 2008.

GAMA, A.; ALVES, A.; SCHMITT, F. Expression and prognostic significance of CK19 in canine malignant mammary tumours. **Veterinary Journal**, v. 184, n. 1, p. 45–51, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19264518>>. Acesso em: 10 jan 2014.

GATIUS, S.; VELASCO, A.; AZUETA, A.; SANTACANA, M.; PALLARES, J.; VALLS, J.; DOLCET, X.; PRAT J.; MATIAS-GUIU, X. FGFR2 alterations in endometrial carcinoma. **Modern Pathology**, v. 24, n. 11, p. 1500–10, 2011.

GOLDHIRSCH, A.; WOOD, W. C.; COATES, A. S.; GELBER, R. D.; THÜRLIMANN, B.; SENN, H. J. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Annals of Oncology*, v. 22, n. 8, p. 1736–1747, 2011.

GOLDSCHMIDT, M.; PEÑA, R.; RASOTTO, R.; ZAPULLI, V. Classification and Grading of Canine Mammary Gland Tumors. **Veterinary Pathology**, v. 48, p. 117, 2011. Disponível em: <<http://vet.sagepub.com/content/48/1/117>>. Acesso em: nov. 2013.

GUIL-LUNA, S.; CÉSPEDES-SÁNCHEZ, S.; MILLÁN, Y.; DE ANDRÉS, F. J. ; ROLLÓN, E. ; DOMINGO, V. ; GUSCETTI, F. ; MARTÍN DE LAS MULAS, J. Aglepristone decreases proliferation in progesterone receptor-positive canine mammary carcinomas. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, p. 518–523, 2011.

HAMMOND, B. M. E. H.; HAYES, D. F.; WOLFF, A. C.; MANGU, P. B.; TEMIN, S. Guideline summary: american society of clinical oncology / college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. **Journal of Oncology Practice**, v. 6, n. 4, p. 195-197, 2010.

HARRIS, L.; FRITSCH, H.; MENNEL, R.; NORTON, L.; RAVDIN, P.; TAUBE, S.; SOMERFIELD, D.; HAYNES, D. F.; BAST JR., R. C. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 33, p. 5287-5312, 2007.

HONG NG, C.; PATHY, N. B.; TAIB, N.A.; MUN, K. S.; RHODES, A.; YIP, C. H. The estrogen receptor negative-progesterone receptor positive breast cancer is a biological entity and not a technical artifact. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, p. 1111-1113, 2012.

HORTA, R. S.; COSTA, M. P.; LAVALLE, G. E.; ARAÚJO, R. B.; CASSALI, G. D. Fatores prognósticos e preditivos dos tumores caninos definidos com auxílio da imuno-histoquímica. **Ciência Rural**, v. 42, n.6, p. 1033-1039, 2012.

HSU, W. L.; HUANG, Y. H.; CHANG, T. J.; WONGB, M. L.; CHANG, S. C. Single nucleotide variation in exon 11 of canine BRCA2 in healthy and cancerous mammary tissue. **The Veterinary Journal**, v. 184, p. 351–356, 2010.

ILLERA, J. C.; PÉREZ-ALENZA, M. D.; NIETO, A.; JIMÉNEZ, M. A.; SILVAN, G.; DUNNER, S.; PEÑA, L. Steroids and receptors in canine mammary cancer. **Steroids**, v. 71, n. 7, p. 541–8, 2006.

KARAYANNOPOULOUS, M.; KALDRYMIDOU, E.; CONSTANTINIDIS, T. C.; DESSIRIS, A. Histological grading and prognosis in dogs with mammary gland carcinomas: application of a human grading method. **Journal of Comparative Pathology**, v. 133, p. 246-252, 2005.

KEAM, B.; IM, S. A.; LEE, K. H.; HAN, S. W.; OH, D. Y.; KIM, J. H.; LEE, S. H.; HAN, W.; KIM, D. W.; KIM, T. Y.; PARK, I. A.; NOH, D. Y.; HEO, D. S.; BANG, Y. J. Ki-67 can be used for further classification of triple negative breast cancer into two subtypes with different response and prognosis. **Breast cancer research**, v. 13, n. 2, R22, 2011. Disponível em: <<http://breast-cancer-research.com/content/13/2/R22>>. Acesso em: 25 out. 2013.

KIM, N. H.; LIM, H. Y.; IM, K. S.; KIM, J. H.; SUR, J.-H. Identification of triple-negative and basal-like canine mammary carcinomas using four basal markers. **Journal of Comparative Pathology**, v. 148 n. 4, p. 298–306, 2013.

LANA, S. E.; RUTTEMAN, G. R.; WITHROW, S. J. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Whithrow & MacEwen's small animal oncology**. 4th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007. cap. 26, p. 619-636.

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, 2005.

MUHAMMADNEJAD, A.; KEYHANI, E.; MORTAZAVI, P.; BEHJATI, F.; HAGHDOOST, I. S. Overexpression of her-2/neu in malignant mammary tumors; translation of clinicopathological features from dog to human. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP**, v. 13, n. 12, p. 6415–21, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23464468>>. Acesso em: 28 nov. 2013.

MUNSON, L.; MORESCO, A. Comparative pathology of mammary gland cancers in domestic and wild animals. **Breast Disease**, v. 28, p. 7–21, 2007.

NOWAK, M.; MADEJ, J. A.; DZIEGEL, P. Correlation in the expression of HER2 receptor and Ki-67 antigen in mammary adenocarcinomas in bitches. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulaway**, v. 49, p. 337-342, 2005.

OLIVEIRA FILHO, J. C.; KOMMERS, G. D.; MASUDA, E. K.; MARQUES, B. M. F. P.; FIGHERA, R. A.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C. S. L. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 177-185, 2010. Disponível em: <www.scielo.br/pdf/pvb/v30n2/v30n2a14.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2014.

PEÑA, L. L.; NIETO, A. I.; PEREZ-ALENZA, D.; CUESTA, P.; CASTANO, M. Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10, n. 3, p. 237–246, 1998.

PEÑA, L.; GAMA, A.; GOLDSCHMIDT, M. H.; ABADIE, J.; BENAZZI, C.; CASTAGNARO, M.; DÍEZ, L.; GÄRTNER, F.; HELLMÉN, E.; KIUPEL, M.; MILLÁN, Y.; MILLER, M. A.; NGUYEN, F.; POLI, A.; SARLI, G.; ZAPPULLI, V.; MARTÍN DE LAS MULAS, J. Canine Mammary Tumors: A Review and Consensus of Standard Guidelines on Epithelial and Myoepithelial Phenotype markers, HER2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 1, p. 127–145, 2013.

PEREIRA, R. S.; SCHWEIGERT, A.; MELO, G. D. de; FERNANDES, F. V. ; SUEIRO, F.A. R. ; MACHADO, G. F. Ki-67 labeling in canine perianal glands neoplasms : a novel approach for immunohistological diagnostic and prognostic. **BMC Veterinary Research**, v. 9, n. 83, p.1-7, 2013. Disponível em <<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1746-6148-9-83.pdf>> Acesso em: 13 jan. 2014.

PEREZ ALENZA, M. D.; PEÑA, L.; DEL CASTILLO, N.; NIETO, A. I. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. **Journal of Small Animal Practice**, v. 41, p. 287-291, 2000.

RAKHA, E. A.; REIS-FILHO, J. S.; ELLIS, I. O. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 120, p. 293–308, 2010.

RESSEL, L.; PULEIO, R.; LORIA, G. R.; VANNOZZI, I.; MILLANTA, F.; CARACAPPA, S.; POLI, A. HER-2 expression in canine morphologically normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissues and its correlation with the clinical outcome. **Research in Veterinary Science**, v. 94, n. 2, p. 299-305, 2012

RIBEIRO, G. M.; BERTAGNOLLI, A. C.; ROCHA, R. M.; CASSALI, G. D. Morphological aspects and immunophenotypic profiles of mammary carcinomas in benign-mixed tumors of female dogs. **Veterinary Medicine International**, v. 12, p. 7, 2012, 432763. doi:10.1155/2012/432763. Disponível em: <<http://www.deepdyve.com/lp/pubmed-central/morphological-aspects-and-immunophenotypic-profiles-of-mammary-Ok02Wo2FqS>>. Acesso em>. 13 jan. 2014.

RUNGSIPIPAT, A.; TATEYAMA, S.; YAMAGUCHI, R.; UCHIDA, K.; MIYOSHI, N.; HAYASHI, T. Immunohistochemical Analysis of c-yes and c-erbB-2 Oncogene Products and p53 Tumor Suppressor Protein in Canine Mammary Tumors. **Journal of Veterinary Medical Sciences**, v.61, n. 1, p. 27–32, 1999.

SANTISTEBAN, M.; REYNOLDS, C.; FRITCHER, E. G. B.; FROST, M. F.; VIERKANT, R. A.; ANDERSON, S. S.; DEGNIM, A. C.; VISSCHER, D. W.; PANKRATZ, V. S.; HARTMANN, L. C. Ki67: a time-varying biomarker of risk of breast câncer in atypical hyperplasia. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 121, n. 2, p.431-437, 2009. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/d10275h1n5p3j752/>>. Acesso em: 20 maio 2010.

SANTOS, A. A.; LOPES, C. C.; RIBEIRO, J. R.; MARTINS, L. R.; SANTOS, J. C.; AMORIN, I. F.; GÄRTNER, F.; MATOS, A. J. Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. **BMC Veterinary Research**, v. 9, p. 1-11, 2013. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1746-6148/9/1>>. Acesso em: 27 set. 2013.

SARTIN, E. A.; BARNES, S.; KWAPIEN, R. P.; WOLFE, L. G. Estrogen and progesterone receptor status of mammary carcinomas and correlation with outcome in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.11, p. 2196-2200, 1992.

SASSI, F.; BENAZZI, C.; CASTELLANI, G.; SARLI, G. Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. **BMC Veterinary Research**, v. 6, p. 2-9, 2010.

SLEECKX, H. R.; KROEZE, E. J. B. V.; GINNEKEN, C. V.; BRANTEGEN, L. V. Canine mammary tumours, an overview. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 1112–1131, 2011.

SORENMO, K. Canine mammary gland tumours. **Veterinary Clinics of North America: small animal practice**, v. 33, p. 573-596, 2003.

SORENMO, K. U.; SHOFER, F. S.; GOLDSCHMIDT, M. H. Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, p. 266-270, 2000.

SORENMO, K. U.; RASOTO, R.; ZAPPULLI, V.; GOLDSCHMIDT, M.H. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. **Veterinary Pathology**, v. 48, p. 85-97, 2011.

TODOROVA, I. Prevalence and etiology of the most common malignant tumours in dogs and cats. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v. 9, n. 2, p. 85-98, 2006.

TONITI, W.; BURANASINSUP, S.; KONGCHAROEN, A.; CHAROONRUT, P.; PUCHADAPIROM, P.; KASORNDORKBUA, C. Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptors in canine mammary tumors. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 10, p. 907-911, 2009.

VAZQUEZ-MARTIN, A.; OLIVERAS-FERRAROS, C.; MENENDEZ, J. A. The antidiabetic drug metformin suppresses HER2 (erbB-2) oncoprotein overexpression

via inhibition of the mTOR effector p70S6K1 in human breast carcinoma cells. **Cell Cycle**, v. 8, n. 1, p. 88-96, 2009.

YAMAGAMI, T.; KOBAYASHI, T.; TAKASHI, K.; SUGIYAMA, M. Prognosis for canine malignant mammary tumours based TNM and histologic classification. **Journal of Veterinary Medical Sciences**, v. 58, n. 11, p. 1079-1083, 1996.

ZUCCARI, D. A. P. C.; PAVAM, M. V.; TERZIAN, A. C. B.; PEREIRA, R. S.; RUIZ, C. M.; ANDRADE, J. C. Immunohistochemical evaluation of e-cadherin, Ki-67 and PCNA in canine mammary neoplasias: Correlation of prognostic factors and clinical outcome. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 207-215, 2008.

Capítulo 4

Estudo dos biomarcadores BRCA1, BRCA2, ERR alfa, beta e gama, FGFR2 e GATA-3 em neoplasias mamárias espontâneas de cães: busca por candidatos a marcadores tumoriais

4 ESTUDO DOS BIOMARCADORES BRCA1, BRCA2, ERR ALFA, BETA E GAMA, FGFR2 E GATA-3 EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS ESPONTÂNEAS DE CÃES: BUSCA POR CANDIDATOS A MARCADORES TUMORAIS

4.1 INTRODUÇÃO

O câncer é apontado como uma doença genética na qual o acúmulo de lesões no DNA leva à proliferação celular desordenada e a outros comportamentos anormais nas células cancerosas.

Sejam na forma de receptores de membrana, produtos de oncogenes ou de constituintes das diversas vias de sinalização, estas alterações genéticas podem se manifestar pela produção de proteínas aberrantes, produção exagerada destas proteínas ou manifestação de proteínas cuja produção deveria estar inibida.

Desta forma é possível, por meio da técnica de imunoistoquímica, a detecção destes produtos protéicos que se caracterizam, seja pela sua presença exagerada ou pela sua ausência, como marcadores da manifestação destas alterações genéticas e que podem ser utilizados como meio diagnóstico, de prognóstico e preditivo no câncer.

Por esta razão, a busca por marcadores tumorais é incessante na Medicina e não menos na Medicina Veterinária, tendo em vista melhor compreender a doença, os mecanismos que a desencadeiam e sua resposta aos diferentes tratamentos.

Este trabalho teve por objetivo avaliar, por meio de estudo imunoistoquímico e PCR em tempo real (qPCR), a expressão gênica dos genes supressores de tumor BRCA1 e BRCA2, do receptor FGFR2, do fator de transcrição GATA-3 e dos receptores relacionados ao receptor de estrógeno $ERR\alpha$, $ERR\beta$ e $ERR\gamma$ assim como sua relação com tipo e grau histológico, com marcadores tumorais já consagrados, como os receptores de estrógeno, marcador de proliferação Ki67 e oncogene HER2 e sua aplicação no diagnóstico e prognóstico na doença neoplásica mamária canina, visando a caracterização molecular e funcional destes biomarcadores, alguns deles ainda não estudados em cães.

4.2 REVISÃO DE LITERATURA

Os tumores de glândula mamária são as neoplasias que mais comumente acometem as fêmeas caninas e representam um grupo altamente heterogêneo em termos de morfologia e comportamento biológico (NERURKAR, 1989; GAMA; ALVES; SCHIMITT, 2008). Cerca da metade dos tumores mamários caninos são considerados malignos e a identificação de fatores prognósticos confiáveis é essencial na quantificação dos riscos individuais de desencadeamento clínico desfavorável (DAGLI, 2008; GAMA; ALVES; SCHIMITT, 2008).

Os genes BRCA1 e BRCA2 codificam proteínas localizadas no núcleo das células e possuem papel essencial na preservação da estrutura e da estabilidade numérica dos cromossomos durante a divisão celular. Acredita-se que a instabilidade cromossômica disparada pela inativação dos genes BRCA seja o principal instigador da carcinogênese na glândula mamária, devido ao seu envolvimento com o reparo do DNA e regulação da citocinese (SCULLY; LIVINGSTON, 2000; VENKITARAMAN, 2002).

Considerados genes supressores de tumor, a inativação de BRCA1 e BRCA2 por perda de heterozigosidade confere um risco de 56 a 87% de desenvolvimento de câncer de mama na mulher estando as mutações somáticas de BRCA2 associadas a metástases agressivas em linfonodos nesta espécie (HSU et al., 2010).

Mutações hereditárias no gene BRCA1 estão associadas ao câncer de mama familiar na mulher e são consideradas raras na maioria dos carcinomas mamários de ocorrência esporádica ou não familiar. No entanto, a perda da expressão do RNA mensageiro e da proteína codificada por este gene ocorre em 40 a 50% dos tumores mamários esporádicos, possivelmente por alterações epigenéticas, particularmente a hipermetilação. Os carcinomas que apresentam expressão reduzida de BRCA1 tipicamente são pouco diferenciados, com alta taxa proliferativa e correlação inversa com o grau histológico (RIBEIRO-SILVA et al., 2005).

Em cães, o estudo da expressão do gene BRCA1 demonstrou que a perda de sua expressão foi associada ao aumento do marcador de proliferação Ki67 e receptor de estrógeno negativo (ER-) entre outras características de malignidade (NIETO et al., 2003).

O estrógeno e seus receptores possuem papel crucial no desenvolvimento e no funcionamento fisiológico das glândulas mamárias, bem como na etiologia do câncer mamário. Nas células cancerosas, o estrógeno promove proliferação celular por meio da estimulação da transição da fase G_1 para a fase S, modificando a expressão de genes hormônio-responsivos como pS2, Bcl-2 e catepsina D e com isso, alterando a citoarquitetura e o fenótipo destas células. No entanto, a via de sinalização celular estrogênica tornou-se mais intrincada com a descoberta de receptores órfãos, denominados “receptores relacionados ao receptor de estrógeno” – ERRs – que estruturalmente e funcionalmente são parentes próximos dos receptores estrogênicos clássicos, $ER\alpha$ e $ER\beta$ (JAZARBEEK et al., 2009).

Os receptores relacionados ao receptor de estrógeno (ERRs) compõe uma família de receptores nucleares intimamente relacionados, denominados ERR alfa, ERR beta e ERR gama ($ERR\alpha$, $ERR\beta$ e $ERR\gamma$), com estreita homologia com $ER\alpha$ no domínio de ligação ao DNA, sugerindo que os ERRs possam modular as ações de $ER\alpha$ (SUZUKI et al., 2004).

Tanto ERs e como ERRs podem se ligar a elementos de resposta ao estrogênio (EREs) contendo o motivo de reconhecimento AGGTCA. Pesquisas realizadas em carcinoma mamário e câncer cervical mostraram que ambos $ER\alpha$ e $ERR\alpha$ -1 podem se ligar à sequência palindrômica ERE e que há competição entre estes dois receptores nucleares (ZHANG; TENG, 2000; KRAUS et al., 2002).

Os receptores tirosina cinase compreendem uma família de moléculas de sinalização envolvidas em diversos processos fisiológicos regulando a proliferação e a diferenciação celular e o mecanismo de apoptose, processos comumente desregulados no câncer (CERLIANI et al., 2012; TENHAGEN et al., 2012). Alterações nas vias de FGFR como amplificações e superexpressão são apontadas em 5 a 30% dos tumores mamários na mulher. Em estudo pré-clínico conduzindo em tecido mamário murino normal e em carcinomas de mama humanos, de 58 pacientes, foi observada que a ação de 17- β -estradiol alterou a expressão e/ou localização de FGFR2 e que 62% das células tumorais das amostras das pacientes apresentavam marcação moderada a intensa de FGFR2 em seu citoplasma (CERLIANI et al., 2012).

Diversos autores têm apontado a ocorrência de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP – *single nucleotide polymorphism*) em FGFR2 como fator de risco para o câncer de mama na mulher e o estudo de sua expressão com valor prognóstico em

relação à sobrevida e ao período livre da doença, sendo sua expressão aumentada associada à pior evolução clínica. O biomarcador FGFR2 constitui-se, assim, em alvo molecular interessante para novas terapias (SUN et al., 2012; TENHAGEN et al., 2012; FLETCHER et al., 2013; SLATTERY et al., 2013).

Não há, até o momento, estudos de expressão de FGFR2 em neoplasias mamárias na espécie canina.

A família de fatores de transcrição GATA, seis deles descritos nos mamíferos, ligam-se a uma sequência consenso do DNA (A/T)GATA(AG) nos promotores de genes alvo, onde são capazes de diretamente promover ou reprimir a expressão gênica. GATA3 é um fator de transcrição que orchestra o perfil de expressão gênica de vários tecidos durante a embriogênese e particularmente no tecido mamário, é responsável pela diferenciação das células luminais nas glândulas mamárias. Imputado como possível gene supressor de tumor, GATA3 parece controlar a diferenciação e a proliferação do câncer mamário, uma vez que a maioria dos tumores de mama na espécie humana provém das células do epitélio luminal (NAYLOR; ORMADY, 2007; FANG; CHEN; WEIGEL, 2009; CHOU; PROVOT; WERB, 2010). Estudos experimentais com camundongos demonstram que a perda de expressão de GATA3 está associada a tumores mamários com alto grau histológico, linfonodos positivos, receptores de estrógenos e progesterona negativos e com a superexpressão de HER2. Por outro lado, sua presença é suficiente para induzir a diferenciação tumoral e impedir a disseminação do câncer de mama, caracterizando este marcador como forte fator preditivo e independente do curso clínico neste tipo de câncer (KOUROS-MEHR et al., 2008).

Em Medicina Veterinária um único relato de estudo imunoistoquímico com membros da família GATA foi descrito, em estudo que avaliou a expressão de GATA4 em tumores de testículos caninos e observou que a expressão de GATA4 está relacionada à origem celular do tumor, estando presente nas neoplasias de origem de células do estroma do cordão sexual e ausentes nas neoplasias das células germinativas (RAMOS-VARA; MILLER, 2009).

Não há, até o momento, estudos de expressão do fator de transcrição GATA3 em glândula mamária canina.

4.3 MATERIAL E MÉTODO

4.3.1 Animais

Foram escolhidos aleatoriamente sessenta animais que fizeram parte do estudo dos marcadores ER α , PR, Ki67 e HER2, utilizando-se dos fragmentos de seus tumores e seus dados epidemiológicos como estadiamento tumoral pelo sistema TNM, exames laboratoriais pré-operatórios incluindo-se radiografias torácicas em três incidências para pesquisa de metástases e as informações obtidas de seu segmento clínico e os resultados obtidos no estudo imunoistoquímico destes marcadores tumorais.

Foram considerados critérios de exclusão e inclusão, os mesmos parâmetros utilizados no estudo anterior.

4.3.2 Amostras de tecido tumoral

Foi utilizado um total de sessenta e oito amostras previamente submetidas a diagnóstico histopatológico e gradação tumoral.

O material utilizado como controle foi composto por doze amostras, sendo oito fragmentos com diagnóstico de lesão epitelial não-neoplásicas – LENN – distribuídos em 3 fragmentos com diagnóstico de adenose e 5 fragmentos com diagnóstico de hiperplasias tubulares assim como dois tumores mistos benignos e dois adenomas complexos.

Dentre as lesões malignas, foram utilizadas 11 amostras com diagnóstico de carcinoma complexo, 12 de carcinoma misto, 19 carcinomas simples, 6 carcinomas túbulo-papilíferos, 6 carcinomas sólidos, um comedocarcinoma e um carcinoma inflamatório. Para efeito de análise estatística, estes dois últimos tipos histológicos foram agrupados como carcinoma sólido.

Em relação à gradação tumoral, quarenta fragmentos possuíam gradação I, 11 fragmentos gradação II e 5 fragmentos gradação III.

Para o estudo da expressão de RNA mensageiro (RNAm) por PCR em tempo real (qPCR), fragmentos de tecido tumoral colhidos por ocasião do ato cirúrgico foram identificados e conservados em nitrogênio líquido até a sua utilização.

4.3.3 Exame histopatológico e gradação tumoral:

A classificação e gradação tumoral baseou-se nos critérios propostos por Cassali et al. (2011) e Goldschmidt et al. (2011).

4.3.4 Marcação imunoistoquímica

As amostras conservadas em parafina foram cortadas em micrótomo em fragmentos de espessura 5µm e montadas em lâminas silanizadas para, posteriormente, serem submetidas ao estudo imunoistoquímico para determinação da expressão dos marcadores tumorais deste estudo.

Foram utilizados como anticorpo primário anticorpos policlonais de coelho anti-BRCA1 (Abcam® diluição 8µl/ml), anti-BRCA2 (Abcam® diluição 1:250) e anti-FGFR2 (Abcam® pré-diluído), anticorpo policlonal de cabra anti-GATA-3 (Abcam® diluição de 4µl/ml) e anticorpos monoclonais de camundongo anti ERRα-1, ERRβ e ERRγ (GeneTex® diluição de 1:50), com os procedimentos de coloração adaptados a cada anticorpo específico, segundo recomendação dos fabricantes.

Resumidamente, lâminas com cortes das preparações com de 5µm de espessura foram desparafinizadas em xilol, gradualmente hidratadas em etanol e em tampão fosfato 0.01 M, pH 7.4 com Tween 20 a 0.05% (PBST) para, então, serem submetidas à recuperação antigênica com tampão EDTA 1mM pH 9.0 em panela de pressão por 3 minutos após o início da fervura. A seguir, as amostras foram submetidas ao bloqueio de peroxidases endógenas com peróxido de hidrogênio a 3% em água destilada por 60 minutos a temperatura ambiente imersas em PBST. Subsequentemente as lâminas foram incubadas com soro de bloqueio TNB® (tampão de bloqueio Tris-NaCl CSH Protocols™) em câmara úmida por 60 minutos a temperatura ambiente, exceto para receptor de estrógeno, cujo bloqueio foi realizado com leite desnatado, por 30 minutos. Após o período de bloqueio as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário específico em temperatura de 4°C em câmara

úmida por uma noite. Ao término do período da incubação, as preparações foram imersas em PBST, submetidas ao complexo polímero-anticorpo secundário utilizando-se o kit EnVision™ (K4061 EnVision™+Dual Link System-HRP DakoCytomation), exceto para a marcação de GATA-3 para a qual foi utilizado o Kit LSAB HRP (K0679 Universal DAKO LSAB®+ Kit, Peroxidase - DakoCytomation) segundo seu protocolo próprio. Após a ação do anticorpo secundário por 30 minutos, as lâminas foram novamente imersas em PBST e submetidas à revelação com uso de diaminobenzidina (K3466 Liquid DAB Large Volume Substrate Chromogen System 3'3 diaminobenzidine, DakoCytomation), contracoradas com Hematoxilina de Mayer, desidratadas por sucessivas passagens em alcoóis progressivamente mais concentrados e xilol e finalmente montadas com Permount® e lamínula. Foram utilizados cortes histológicos que apresentaram marcação positiva durante a padronização dos diversos anticorpos em estudo, para controle positivo e fragmentos histológicos positivos para os quais foi omitido o anticorpo primário como controle negativo.

4.3.5 Aquisição de imagem e contagem da marcação imunoistoquímica

Ao fim do estudo imunoistoquímico os cortes histológicos foram avaliados em microscópio NIKON® em campos de 100, 200 e 400 aumentos. Na dependência da qualidade do corte histológico, cinco a 10 campos de aumento 400x de cada lâmina foram aleatoriamente selecionados e suas imagens registradas por meio de software de aquisição de imagem Image-Pro Plus versão 4.5.0.29® (Media Cybernetics™, Inc.). As imagens assim obtidas foram submetidas à contagem manual de células marcadas e não marcadas totalizando-se a contagem mínima de 500 células por lâmina, exceto para FGFR2, cuja avaliação se fez pela utilização do QuickScore.

4.3.6 Obtenção dos escores e índices de marcação tumoral

Os dados obtidos das contagens dos diversos marcadores foram convertidos em escores conforme o biomarcador em estudo.

Para BRCA1, BRCA2 e para os ERRs foram consideradas positivas as células cujos núcleos apresentaram marcação em tom marrom escuro acima da marcação de *background* e negativas aquelas nos quais seus núcleos não apresentaram nenhuma marcação. Os escores destes marcadores foram obtidos calculando-se a proporção de células positivas em relação ao total de células contadas.

Para ERR α foi considerado positivo o tumor que atingiu marcação maior que 10% de suas células.

Os níveis de expressão de FGFR2, por sua característica de marcação de membrana citoplasmática e por vezes também nuclear, teve seu escore avaliado com base na intensidade e distribuição da marcação. A marcação, quando no citoplasma, foi pontuada em 0 (sem marcação); 1 (marcação fraca = amarelo claro); 2 (marcação moderada = marrom amarelado) e 3 (marcação forte = marrom). A porcentagem de distribuição da marcação no corte histológico foi graduada em 0 (ausência de células marcadas); 1 (menos de 10% das células marcadas); 2 (entre 10 a 50% das células marcadas) e 3 (mais de 50% das células marcadas). O escore final para o citoplasma foi obtido pelo produto do escore de intensidade e o escore de distribuição, em escala de 0 a 9 (marcação forte em todas as células). Tumores com escores maiores de 4 foram considerados de alta expressão ou positivos. O escore de marcação nuclear foi obtido da relação porcentual das células com núcleo marcado em relação ao total de células. Os tumores foram considerados positivos quando atingiram contagem maior ou igual a 55% de núcleos marcados positivamente, conforme relatado por Sun et al. (2012).

Para GATA3 considerou-se positiva a célula com marcação nuclear e seu escore obtido por meio do método HistoScore no qual se multiplica a porcentagem de células com marcação fraca por um, porcentagem de células com marcação moderada por 2 e porcentagem de células com marcação forte por 3 para se obter o escore entre 0 (zero) e trezentos conforme estabelecido por Yoon et al. (2009).

Uma vez que não há padronização para a marcação de BRCA2 e GATA3 em tumores mamários caninos e na literatura médica os limites de corte variam consideravelmente entre os diversos autores, neste trabalho foi considerado negativo o tumor que teve seu escore abaixo do limite superior do primeiro quartil (25° percentil).

4.3.7 Estudo de expressão gênica

Para obtenção da sequência codificante dos genes BRCA1, BRCA2, GATA-3, FGFR2 e ERR α , β e γ o RNAm total proveniente de tecido tumoral foi extraído por meio da utilização de Trizol® (Life Technologies® – USA) conforme recomendações do fabricante. Resumidamente 100 mg de tecido previamente congelado foi moído em um mortar contendo nitrogênio líquido até que fosse obtido um pó fino. A seguir, o material foi homogeneizado com 1mL de Trizol® (Life Technologies®), incubado por 5 minutos a temperatura ambiente para, após a adição de 0,2 mL de clorofórmio, ser submetido a novo período de incubação. As amostras, a seguir, foram centrifugadas a 12.000G a 4°C por 15 minutos para permitir que as amostras sofressem separação em fases. A fase aquosa, rica em RNA, foi transferida para um novo tubo para sofrer precipitação com álcool isopropílico. Após a ação do álcool, o tubo foi novamente centrifugado a fim de se obter um botão com aspecto gelatinoso, correspondente ao RNA precipitado. A seguir, a amostra foi lavada com etanol a 70%, homogeneizada e novamente centrifugada. O botão assim obtido, correspondendo ao RNA livre de impurezas, foi eluído em 30 μ L de água DEPC, quantificado por meio do espectro de luz (260nm) utilizando-se espectrofotômetro NanoDrop® e sua integridade observada em gel de agarose 1,5%, por meio da visualização das bandas 18S e 28S.

A seguir, as amostras de RNAm foram padronizadas, por meio de diluição com água DEPC, a 1 μ g/ml e conservadas em freezer a -80°C até a sua utilização.

Na execução da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real – qPCR, as amostras, após tratadas com DNase (Deoxyrinonuclease I, Invitrogen), purificadas e padronizadas, tiveram seu RNAm total submetidas à transcrição para obtenção do clone de DNA (cDNA) total dos genes expressos nos tecidos analisados, por meio de transcrição reversa do RNAm e síntese da fita molde cDNA. Para a obtenção do cDNA dos genes em estudo foram utilizados *primers* (oligonucleotídeos) *sense* e *anti-sense* adicionados de sequências de restrição *tag* e *start códon* específicos para os genes BRCA1, BRCA2, GATA-3, FGFR2 e das três isoformas de ERR: ERR α , ERR β e ERR γ caninos (Gene Expression Life Technologies®). Tendo em vista a baixa expressão dos genes em estudo, amostras que apresentaram alguma leitura

no procedimento de PCR em tempo real foram selecionadas e seu RNAm submetido a nova transcrição para obtenção de cDNA, mediante amplificação com premix SuperScript® VILO™ Master Mix (11755050 Life Technologies®). Desta forma, obtiveram-se para os estudos de expressão gênica por meio de PCR em tempo real, vinte e oito amostras distribuídas em 4 amostras controle, compostas de lesões epiteliais não neoplásicas (hiperplasia tubular) e 24 carcinomas, distribuídos em 6 carcinomas complexos, 5 carcinomas mistos, 8 carcinomas simples, 3 carcinomas túbulo-papilífero, um carcinoma sólido e um comedocarcinoma com padrão sólido.

Utilizando-se de placa de 96 poços, três alíquotas independentes de cada amostra, contendo 50ng de cDNA foram, então, submetidas ao sistema TaqMan Assay® (Life Technologies®), processadas no sistema de PCR em tempo real Applied 7500 (Applied Biosystems 7500) e analisadas em software específico (Sequence Detection Software v1.3 Applied Biosystems).

Todos os procedimentos foram realizados em conformidade com as recomendações do fabricante.

4.3.8 Quantificação dos resultados da expressão dos genes em estudo por meio do PCR

Para a análise da expressão gênica obtida por meio de PCR em tempo real, utilizou-se o método de comparação, também denominado método 2 delta CT ($2^{\Delta\Delta Ct}$).

Primeiramente, obteve-se a normalização de cada amostra por meio da diferença dos valores obtidos na leitura das amostras tumorais (Ct alvo) e dos tecidos não neoplásicos (Ct referência) com a leitura pareada de um gene endógeno (*housekeeping*) conhecido (Ct *housekeeping*) que, neste estudo, foi utilizado o gene de codificação de *beta 2 microglobulina*, obtendo-se, assim o valor delta Ct das amostras tumorais (ΔCt alvo) e de controle (ΔCt ctrl).

Os valores de ΔCt ctrl foram, então, convertidos em valor de referência (ΔCt ref) por meio da média geométrica de suas leituras.

A seguir, obteve-se o valor de $\Delta\Delta Ct_n$ das amostras tumorais por meio da diferença ΔCt alvo – ΔCt ref, onde n é o número da amostra.

Considerou-se o valor da expressão gênica de cada amostra tumoral o resultado da potência de $\Delta\Delta Ct_n$ em base 2 ($2^{\Delta\Delta Ct}$).

Para fins estatísticos foi utilizada a razão do valor obtido de cada amostra ($2^{\Delta\Delta Ct}$) com valor da média geométrica referência das amostras controle obtendo-se, desta forma, valores em escala maiores ou menores do valor de referência 1 (controle). Os limites de corte para as análises de sobrevida basearam-se no relato de Koplefleish e Gruber (2009) que fixaram os limites do quociente de expressão em $\leq 0,5$ como subexpressão gênica e $\geq 2,0$ como superexpressão.

4.3.9 Avaliação da sobrevida

Foram considerados para este estudo, os animais com diagnóstico de neoplasia mamária há, pelo menos, 18 meses, equivalente a 5 anos de acompanhamento em seres humanos, conforme sugerido por Lebeau³ (1953 apud DAGLI, 2008, p. 228) totalizando 40 meses de estudo.

Para fins estatísticos foi considerado o início do período de segmento a data da mastectomia e evento final a morte inequivocamente associada à doença neoplásica maligna, tal como morte por caquexia neoplásica ou eutanásia decorrente a metástase pulmonar ou outra complicação decorrente da doença.

4.3.10 Análise estatística

Os marcadores BRCA2, GATA3 e ER α , por seus escores se comportarem como variável contínua sua imunorreatividade foi avaliada em função dos escores categorizados do tipo e grau histológico, do estadiamento clínico, dos marcadores previamente estudados (ER α , PR, Ki67 e HER2), das classificações moleculares obtidas por meio destes marcadores e finalmente, dentre os marcadores candidatos. Para este estudo, utilizou-se do teste *t* de Student ou análise de variância - ANOVA

³ LEBEAU, A. L'age du chien et celui de l'homme. Essai de statistique sur la mortalité canine. **Bulletin de l'Academie Veterinaire de France**, v. 26, p. 229-232, 1953.

Quando transformados em variável dicotômica (positivo/negativo) os escores dos marcadores candidatos foram avaliados pelo método do Qui-quadrado de Pearson ou pelo Teste Exato de Fischer, quando aplicável, em função do tipo e grau histológico, do estadiamento clínico, dos marcadores previamente estudados (ER α , PR, Ki67 e HER2), das classificações moleculares obtidas por meio destes marcadores e dentre os próprios marcadores candidatos.

O estudo de sobrevida foi realizado com as variáveis categorizadas, por meio de análise estatística univariada utilizando-se o modelo de riscos de COX e método de Kaplan-Meier para obtenção das curvas de sobrevida e teste de log-rank de Mantel-Cox para comparação entre os grupos.

A análise de sobrevida multivariada foi realizada utilizando-se do modelo de riscos proporcionais de Cox.

Foi considerado grupo controle na avaliação dos marcadores frente ao tipo histológico e grau histopatológico do tumor as amostras de tecido mamário com lesão epitelial não neoplásica e os tumores benignos.

Considerou-se diferença estatisticamente significativa $P < 0.05$ e intervalo de confiança de 95% (IC 95%).

Para os cálculos estatísticos foram utilizados os programas Prism 5 for Windows® v. 5.0 (GraphPad Prism®) – ANOVA, Kaplan-Meier e construção dos gráficos e MedCalc v. 12.7.7 for Windows® (MedCalc software bvba) para pesquisa de valores atípicos (*outliers*) e para os testes do Qui-quadrado de Pearson, correlação de Pearson, correlação de Spearman e modelo de riscos proporcionais de Cox.

4.4 RESULTADOS

O material em estudo foi obtido de 60 animais da espécie canina, de sexo feminino, com idade média ao diagnóstico de $10,0 \pm 2,6$ anos, de diversas raças, com maior prevalência para os animais sem raça definida.

Destes animais, treze haviam sido castrados previamente ao diagnóstico, sete apresentaram diagnóstico histopatológico de invasão neoplásica em linfonodo

inguinal ou axilar e 4 receberam diagnóstico radiográfico de metástase pulmonar por ocasião da realização dos exames complementares.

Dos animais selecionados para este estudo, 31 animais ainda estavam vivos e 29 haviam morrido. Entre as mortes, 12 foram atribuídos ao câncer de mama e as demais (17 animais) a outras causas como envelhecimento natural, insuficiência cardíaca ou insuficiência renal.

Não foi possível obter marcação imunoistoquímica de BRCA1, ERR β e ERR γ , apesar das diversas tentativas de padronização utilizando-se de diferentes diluições para o anticorpo primário, diferentes métodos de recuperação antigênica, de sistema composto polímero anticorpo-secundário e tampões com diferentes índices de pH.

Dos estudos da imunorreatividade dos marcadores BRCA2, ERR α e GATA3 como variável contínua, GATA3 apresentou diferença significativa em função do tipo e grau histológico, bem como da pontuação de ER α e de FGFR2 dicotomizadas e por esta razão, apenas estes estudos foram incluídos nos resultados.

Nos estudos de expressão de RNAm foi selecionado o material de 26 animais agrupados por raça conforme tabela 19, com maior número de animais sem raça definida e da raça poodle, na população estudada.

Tabela 19 - Frequência de ocorrência das raças dos animais utilizados nos estudos de qPCR – São Paulo – 2014

Raça	n
Srd	11
Poodle	6
cocker spaniel inglês	2
beagle	1
bichon frise	1
boxer	1
dobermann	1
fox terrier	1
rotweiller	1
shih tzu	1
Total	26

n = frequência de ocorrência do evento
(x%) proporção do evento da população
srd – animais sem raça definida

Não se obteve, ainda que com a utilização do sistema SuperScript® VILO™ Master Mix, amplificação das amostras para estudo de FGFR2. Para fins

estatísticos, por se tratar de exemplar único de adenose uma amostra não pode ser incluída no modelo estatístico de análise de variância (ANOVA).

A expressão do biomarcador BRCA1 foi avaliada, portanto, apenas por meio de qPCR. Na avaliação da expressão de RNA de BRCA1, observou-se a expressão do comedocarcinoma 1,54 vezes maior que a expressão da média geométrica do grupo controle, enquanto uma amostra de hiperplasia tubular apresentou sua expressão 1,26 vezes maior que a expressão de referência. Para as demais amostras, a faixa de expressão ficou entre 0,015 a 0,97 vezes o valor de referência, com o maior valor de expressão de uma neoplasia maligna em 0,74 vezes a expressão da média do grupo controle.

Quando agrupada em função do tipo histológico dos tumores, a expressão de BRCA1 por qPCR apresentou diferença estatística significativa no teste de ANOVA com média do grupo controle (Ctrl) $1,00 \pm 0,1843$ e $P < 0,0001$ para IC 95% e diferença estatística altamente significativa entre os grupos controle e os grupos dos carcinomas complexo, misto, simples e túbulo-papilífero no pós-teste de Dunnett de múltipla comparação. As amostras de um animal tiveram sua mensuração indeterminada e não foi incluída no estudo.

O quadro 13 e o gráfico 35 resumam os resultados obtidos para este gene com a técnica de qPCR.

Quadro 13 – Distribuição da razão da expressão de BRCA1 em função do grupo controle para diferentes tipos histológicos de tumor mamário. $P < 0,05$ ANOVA – São Paulo – 2014

BRCA1	Grupos					
	Ctrl	Ca cplx	Ca mst	Ca spl	Ca tbp	Ca sld
Número de amostras	4	5	5	8	3	2
Média por grupo	1,000	0,3175	0,1088	0,2191	0,1540	0,8888
Desvio padrão	0,1843	0,2565	0,1400	0,2078	0,1747	0,9197
Erro padrão	0,09214	0,1147	0,06260	0,07346	0,1009	0,6503

Ctrl – controle; Ca cplx – carcinoma complexo; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca tbp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido

Gráfico 35 - Representação gráfica do quociente da expressão dos tumores ($2^{\Delta Ct}$ alvo) para BRCA2 agrupados por tipo histológico e em função da expressão do grupo controle ($2^{\Delta Ct}$ controle). Média do grupo controle (Ctrl) $1,00 \pm 0,1843$ $P < 0,0001$ IC de 95% ANOVA. Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; * diferença significativa ($P < 0,05$ no pós-teste de Dunnett de múltipla comparação) entre o grupo Ctrl e o grupo marcado com o mesmo sinal; • refere-se a valor atípico (*outlier*); Ctrl – controle; Ca cplx – carcinoma complexo; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca tbp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido; n = 25 amostras tumorais – São Paulo – 2014

Relação da expressão de BRCA1 vs controle

Também na análise da expressão de BRCA1 em função do grau histológico do tumor obteve-se significância estatística com $P < 0,0001$ e média do grupo Ctrl igual a $1,0 \pm 0,1843$ para 95% IC no teste de ANOVA e diferença estatística significativa no pós-teste de Dunnett de múltipla comparação entre os grupos controle e GI e II. O quadro 14 o gráfico 36 sumarizam os resultados obtidos em função do grau.

Quadro 14 – Distribuição da razão da expressão de BRCA1 em função do grupo controle e grau histológico do tumor mamário. $P < 0,05$ ANOVA – São Paulo – 2014

BRCA1	Grupos			
	Ctrl	GI	GII	GIII
Número de amostras	4	17	4	4
Média por grupo	1,000	0,2082	0,2015	1,000
Desvio padrão	0,1843	0,2173	0,1508	0,1843
Erro padrão	0,09214	0,05270	0,07539	0,09214

Ctrl – controle, GI, GII, GIII – grau histológico 1, 2 e 3

Gráfico 36 - Representação gráfica do quociente da expressão dos tumores ($[\Delta\Delta Ct]$) para BRCA1 agrupados por grau histológico e em função da expressão do grupo controle. Média do grupo controle (Ctrl) $1,00 \pm 0,1843$ $P < 0,0001$ IC de 95% ANOVA. Na representação em boxplot de Tuckey, a caixa representa os percentis de 25 a 75%, a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os limites superior e inferior do intervalo de confiança; * refere diferença significativa no pós-teste de Dunnett de múltipla comparação entre o grupo Ctrl e o grupo marcado com o mesmo sinal; • refere-se a valor atípico (*outlier*). N = 25 amostras tumorais; Ctrl – controle; GI – grau 1; GII – grau 2; GIII – grau 3 – São Paulo – 2014

Relação da expressão de BRCA1 vs controle

Não houve, no entanto, significância estatística nas análises de sobrevida em função da expressão de BRCA1 avaliada por meio de PCR em tempo real e por esta razão estes resultados não foram incluídos.

Dos biomarcadores que permitiram estudo imunoistoquímico, o comportamento da imunorreatividade de BRCA2 como variável categórica foi avaliado em função dos dados obtidos dos demais marcadores em estudo e, também, com base na classificação molecular dos tumores conforme proposto por Sassi et al. (2010), aqui denominada CMSa e a classificação molecular proposta por Goldhirsch et al. (2011), aqui denominada CMGs por meio de tabela de contingência submetida ao teste do Qui-quadrado ou de Exato de Fischer.

Nos estudos imunoistoquímicos da expressão de BRCA2 em função do tipo e grau histológico, estadiamento clínico e classificação molecular, não se observaram significância estatística no teste do Qui-quadrado, conforme sumarizado nos quadros 15 e 16, com $P > 0,05$ nos modelos de cruzamento propostos.

Quadro 15 – Avaliação da imunorreatividade de BRCA2 em função do tipo e grau histológico e estadiamento clínico P = significância no teste do Qui-quadrado; n = total de amostras – São Paulo – 2014

BRCA2	Imunorreatividade nuclear			
	positiva	negativa	P	N
Tipo histológico			0,7055	68
Benigno/lenn	9	3		
Carcinoma				
<i>complexo</i>	9	2		
<i>misto</i>	10	2		
<i>simples tubular</i>	13	6		
<i>túbulo-papilífero</i>	3	3		
<i>Sólido</i>	6	2		
Grau			0,7057	56
1	30	10		
2	7	4		
3	1	4		
Estádio			0,3145	60
I	8	5		
II	17	3		
III	10	6		
IV	5	2		
V	4	0		

Quadro 16 – Avaliação da imunorreatividade de BRCA2 em função das classificações CMSa e CMGS. P = significância no teste do Qui-quadrado; n = total de amostras – São Paulo – 2014

BRCA2	Imunorreatividade nuclear			
	positiva	negativa	P	N
CMSa			0,3679	68
HER2	1	0		
luminal A	43	15		
luminal B	5	1		
Triplo negativo	1	2		
CMGS			0,5205	68
HER2	1	0		
luminal A	33	11		
luminal B HER-	10	4		
luminal B HER+	5	1		
Triplo negativo	1	2		

A comparação entre a imunorreatividade de BRCA2 como escore positivo/negativo e os demais marcadores estudados não demonstrou significância

estatística, exceto para a marcação de receptor de progesterona (PR), que apresentou significância, com $P = 0,0383$ no teste Exato de Fisher, conforme apresentado nos quadros 17 e 18, na comparação com os marcadores previamente estudados e 18, para os candidatos a biomarcadores.

Quadro 17 – Avaliação da imunorreatividade de BRCA2 em função dos demais marcadores. P = significância no teste do Exato de Fischer; n = total de amostras – São Paulo – 2014

BRCA2	Imunorreatividade nuclear			
	Positiva	negativa	P	n
ERα			0,7327	68
Positivo	41	14		
Negativo	9	4		
PR			0,0383	68
Positivo	48	14		
Negativo	2	4		
Ki67			0,7789	68
Positivo	20	6		
Negativo	30	12		
HER2			0,6656	68
Positivo	6	1		
Negativo	44	17		

Quadro 18 – Avaliação da imunorreatividade de BRCA2 em função dos demais marcadores. P = significância no teste do Exato de Fischer; n = total de amostras – São Paulo – 2014

BRCA2	Imunorreatividade nuclear			
	Positiva	negativa	P	n
ERRα				
Positivo	36	15	0,4215	60
Negativo	8	1		
GATA3			0,7612	68
Positivo	36	4		
Negativo	14	4		
FGFR2			0,7824	68
Positivo	28	9		
Negativo	22	9		

A sobrevida dos animais em função da expressão de BRCA2 também foi objeto de estudo. A análise de log-rank para fração de sobrevida em função de BRCA2 não apresentou diferença significativa entre os grupos, com $P = 0,4843$ ($X^2 = 0,4891$ GL = 1), com média de sobrevida de $30,75 \pm 3,1$ meses para os animais com

tumores negativos e de $30,27 \pm 2,2$ meses nos animais com tumores positivos para BRCA2. Teste log-rank de Mantel-Cox: $P = 0,6577$ $X^2 = 0,1964$ GL 1; Fração de Risco (HR – Hazard ratio) não significativa. O mesmo estudo submetido à análise univariada com o modelo de riscos proporcionais de COX não apresentou significância estatística.

O gráfico 37 apresenta a curva de Kaplan-Meier de sobrevida para BRCA2.

Gráfico 37 - Curva de Kaplan-Meier de probabilidade de sobrevida em função da imunorreatividade do marcador tumoral BRCA2 considerando-se a data da mastectomia evento inicial e a morte por neoplasia mamária maligna evento final. Teste log-rank de Mantel-Cox: $P > 0,05$ $X^2 = 0,1964$ GL 1. n = 56 animais – São Paulo – 2014

Uma vez que foi possível a marcação imunoistoquímica com BRCA2, procedeu-se às análises obtidas por este marcador. As figuras 8A, 8B e 8C exemplificam a marcação imunoistoquímica de BRCA2 em tecido mamário neoplásico.

Por se tratar de anticorpo policlonal, são esperadas reações inespecíficas com o interstício e por esta razão, a marcação de BRCA2 neste trabalho apresenta marcação de fundo ou *background*.

Figura 8 - Imagens fotográficas de padrões de imunorreatividade de BRCA2 de lâminas de corte histológico de tecido neoplásico ou mamário, obtidas com câmara digital acoplada à ocular de microscópio de luz. Magnitude equivalente a 400x. – São Paulo – 2014

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental da FMVZ/USP

Fotomicrografias quando digitalizadas e manejadas por editores de texto perdem sua relação com a magnitude que originalmente a gerou. Por esta razão, não foi incluída barra de escala nas imagens

Diferentemente de BRCA1, BRCA2 não apresentou diferença estatística de sua expressão em função do tipo histológico quando avaliada por meio de PCR em tempo real, com $P = 0,0825$ no teste de ANOVA para IC 95% e média do grupo

controle de $1,0 \pm 0,23$, No entanto, em função do grau histológico a expressão de BRCA2 apresentou diferença significativa na análise de variância, com $P = 0,0127$ para IC 95% e diferença significativa entre os grupos controle em comparação a GI e GII no pós-teste de Dunnett de múltipla comparação. Os quadros 19 e 20 e os Gráficos 38 e 39 resumizam os dados obtidos de BRCA2 em função do tipo e grau histológico. As amostras de dois animais tiveram sua mensuração indeterminada e não foram incluídas no estudo.

Quadro 19 – Distribuição da razão da expressão de BRCA2 em função do grupo controle para diferentes tipos histológicos de tumor mamário. $P > 0,05$ ANOVA – São Paulo – 2014

BRCA2	Grupos					
	Ctrl	Ca cplx	Ca mst	Ca spl	Ca tbp	Ca sld
Número de amostras	4	5	4	8	3	2
Média por grupo	1,000	0,3335	0,2926	0,4913	0,2372	0,6199
Desvio padrão	0,2307	0,4663	0,2121	0,4946	0,1729	0,01210
Erro padrão	0,1154	0,2085	0,1061	0,1749	0,09984	0,008558

Ctrl – controle; Ca cplx – carcinoma complexo; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca tbp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido

Gráfico 38 - Representação gráfica do quociente da expressão dos tumores ($2^{\Delta Ct}$ amostra) para BRCA2 agrupados por tipo histológico e em função da expressão do grupo controle ($2^{\Delta Ct}$ controle). Média do grupo controle (Ctrl) $1,00 \pm 0,1843$ $P < 0,0001$ IC de 95% ANOVA. Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; * diferença significativa ($P < 0,05$ no pós-teste de Dunnett de múltipla comparação) entre o grupo Ctrl e o grupo marcado com o mesmo sinal; • refere-se a valor atípico (*outlier*); Ctrl – controle; Ca cplx – carcinoma complexo; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca tbp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido; n = 24 amostras tumorais – São Paulo – 2014

Relação da expressão de BRCA2 vs controle

Quadro 20 – Distribuição da razão da expressão de BRCA2 em função do grupo controle para o grau histológico do tumor mamário. $P > 0,05$ ANOVA – São Paulo – 2014

BRCA2	Grupos			
	Ctrl	GI	GII	GIII
Número de amostras	4	16	4	2
Média por grupo	1,000	0,4248	0,1708	0,6199
Desvio padrão	0,2307	0,4217	0,1859	0,01210
Erro padrão	0,1154	0,1054	0,09293	0,008558

Ctrl – controle, GI, GII, GIII – grau histológico 1, 2 e 3

Gráfico 39 - Representação gráfica do quociente da expressão dos tumores ($[\Delta\Delta Ct]$) para BRCA2 agrupados por grau histológico e em função da expressão do grupo controle. Média do grupo controle (Ctrl) $1,00 \pm 0,1843$ $P < 0,0001$ IC de 95% ANOVA. Na representação em boxplot de Tuckey, a caixa representa os percentis de 25 a 75%, a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os limites superior e inferior do intervalo de confiança; * refere diferença significativa no pós-teste de Dunnett de múltipla comparação entre o grupo Ctrl e o grupo marcado com o mesmo sinal; • refere-se a valor atípico (*outlier*). $n = 24$ amostras tumorais; Ctrl – controle; GI – grau 1; GII – grau 2; GIII – grau 3 – São Paulo – 2014

Relação da expressão de BRCA2 vs controle

À semelhança de BRCA1, não houve significância estatística nas análises de sobrevida em função da expressão de BRCA2 avaliada por meio de PCR em tempo real, com $P = 0,0753$ no teste de log-rank ($X^2 = 3,163$ GL 1) e a representação gráfica e os dados de sobrevida não foram incluídos nestes resultados.

Buscando correlacionar a expressão de BRCA2 avaliada por imunoistoquímica e por PCR em tempo real, os resultados obtidos em ambas as metodologias foram submetidos na forma de variável contínua à análise do

coeficiente de correlação de Pearson. Não houve correlação entre ambas as metodologias, com $r = -0,1298$ e $r^2 = 0,01684$ com $P = 0,5364$ para 95% IC. Os mesmos dados foram submetidos à análise não paramétrica com o teste de coeficiente de Spearman, também não demonstrando correlação entre as amostras, com $r = -0,1709$ e $P = 0,4141$ para IC 95%. O gráfico 40 apresenta a distribuição das amostras no teste de correlação entre a marcação imunoistoquímica e a expressão de RNAm por qPCR.

Gráfico 40 - Representação gráfica da correlação entre os escores de BRCA2 obtidos por imunoistoquímica e da expressão deste marcador obtida por meio de PCR em tempo real. $r = -0,1298$ e $r^2 = 0,01684$ com $P = 0,5354$ e IC 95% - Coeficiente de Correlação de Pearson. N = 26 – São Paulo – 2014

Em relação aos receptores relacionados ao receptor de estrógeno, apenas ER α permitiu marcação imunoistoquímica, conforme apresentada nas figuras 9A e 9B que exemplificam a resposta imunoistoquímica em tecido mamário neoplásico.

Figura 9 - Imagens fotográficas de padrões de imunorreatividade de ERR α de lâminas de corte histológico de tecido neoplásico ou mamário, obtidas com câmara digital acoplada à ocular de microscópio de luz. Magnitude equivalente a 400x – São Paulo – 2014

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental da FMVZ/USP

Fotomicrografias quando digitalizadas e manejadas por editores de texto perdem sua relação com a magnitude que originalmente a gerou. Por esta razão, não foi incluída barra de escala nas imagens

Nos estudos da imunorreatividade de ERR α , o material de 4 tumores e 3 lesões não neoplásicas não apresentaram qualidade para leitura e não puderam ser repetidos devido à insuficiência de tecido tumoral nos blocos de parafina, impossibilitando corte histológico de qualidade. Assim, a amostra de ERR α foi composta por quatro tumores benignos, 5 lesões epiteliais não neoplásicas (duas adenoses e 3 hiperplasias tubulares) e 51 tumores malignos distribuídos em 9 carcinomas complexos, 11 carcinomas mistos; 18 carcinomas simples, 6 carcinomas túbulo-papilíferos e um grupo de 7 carcinomas sólidos, dentre os quais foram incluídos um comedocarcinoma com padrão sólido e um carcinoma inflamatório. Em relação à classificação dos tumores por grau histológico, as amostras submetidas ao estudo ERR α foram compostas por 38 tumores de grau I, 9 tumores de grau 2 e 4 tumores de grau III.

A expressão imunoistoquímica de ERRA em função do tipo e grau histológico, estadiamento, e em razão dos demais marcadores estudados, não apresentou significância estatística exceto para a classificação molecular CMSa, conforme sumarizado nos quadros 21 e 22.

Quadro 21 – Avaliação da imunorreatividade de ERRA em função do tipo e grau histológico, estadiamento clínico e classificações CMSa e GMGs. *P* = significância no teste do Qui-quadrado; n = total de amostras – São Paulo – 2014

ERRα	Imunorreatividade nuclear			
	positiva	negativa	<i>P</i>	<i>N</i>
Tipo histológico			0,5102	60
Benigno/lenn	6	3		
Carcinoma				
<i>complexo</i>	9	0		
<i>misto</i>	9	2		
<i>simples tubular</i>	16	2		
<i>túbulo-papilífero</i>	5	1		
<i>sólido</i>	6	1		
Grau			0,2237	52
1	33	5		
2	9	0		
3	3	1		
Estádio			0,5453	55
I	12	1		
II	14	4		
III	14	1		
IV	4	1		
V	4	0		
CMSa			0,0334	60
HER2	0	1		
luminal A	44	7		
luminal B	6	0		
Triplo negativo	1	1		
CMSa			0,0594	60
HER2	0	1		
luminal A	33	6		
luminal B HER-	11	1		
luminal B HER+	6	0		
Triplo negativo	1	1		

Quadro 22 – Avaliação da imunorreatividade de BRCA2 em dos demais marcadores e das classificações CMSa e CMGS. *P* = significância no teste do Exato de Fischer; n = total de amostras – São Paulo – 2014

ERRα	Imunorreatividade nuclear			
	positiva	negativa	<i>P</i>	N
ERα			1,000	60
positivo	41	7		
negativo	10	2		
PR			0,1581	60
positivo	48	7		
negativo	3	2		
Ki67			1,000	60
positivo	20	3		
negativo	31	6		
HER2			1,000	60
positivo	6	1		
negativo	45	8		
BRCA2			0,4215	60
positivo	36	8		
negativo	15	1		
GATA3			1,000	60
Positivo	38	7		
negativo	13	2		
FGFR2			1,000	60
Positivo	27	5		
negativo	24	4		

Não houve, também, significância estatística nos estudos de sobrevida dos animais em função da expressão de ERRα. Na análise de log-rank para fração de sobrevida em função de ERRα, obteve-se $P = 0,9660$ ($X^2 = 0,001812$ GL = 1), com média de sobrevida de 24,3 3,3 meses os animais com tumores negativos e de 31,2 ± 1,9 meses para animais com tumores positivos para ERRα. O gráfico 41 apresenta a curva de Kaplan-Meier se sobrevida em função da imunomarcagem de ERRα.

Gráfico 41 - Curva de Kaplan-Meier de probabilidade de sobrevida em função da imunorreatividade do marcador tumoral $ERR\alpha$ considerando-se a data da mastectomia evento inicial e a morte por neoplasia mamária maligna evento final. Teste log-rank de Mantel-Cox: $P > 0,05$ $X^2 = 0,001812$ GL 1. n = 51 animais – São Paulo – 2014

Sobrevida em função da imunorreatividade de $ERR\alpha$

Quando avaliados por qPCR, os dados obtidos dos três receptores relacionados ao receptor de estrógeno $ERR\alpha$, $ERR\beta$ e $ERR\beta\gamma$, por serem marcadores intimamente relacionados, foram analisados em conjunto. Nenhum destes marcadores demonstrou, na análise de variância executada em função do tipo histológico e grau histopatológico, significância estatística.

Dado relevante para estes biomarcadores em relação à sua expressão de RNAm, foram suas médias bastante baixas de expressão com intervalos de valores mínimos e máximos bastante amplos.

Os quadros 23 e 24 e o gráfico 42A, 42B, 42C, 42D, 42E e 42F sumarizam os dados obtidos dos três receptores em função do tipo e grau histológico.

Quadro 23 – Distribuição da razão da expressão de $ERR\alpha$, $ERR\beta$ e $ERR\gamma$ em função do grupo controle para diferentes tipos histológicos de tumor mamário. $P > 0,05$ ANOVA – São Paulo – 2014

	Grupos					
	Ctrl	Ca cplx	Ca mst	Ca spl	Ca tbp	Ca sld
$ERR\alpha$						
Número de amostras	4	5	5	8	3	4
Média por grupo	1,000	1,586	0,6449	0,7100	0,5915	1,000
Desvio padrão	0,1241	2,185	0,7612	1,206	0,8899	0,1241
Erro padrão	0,06204	0,9770	0,3404	0,4264	0,5138	0,06204
$ERR\beta$						
Número de amostras	4	5	4	8	3	2
Média por grupo	1,000	0,4526	0,6943	0,04456	0,9509	0,2292
Desvio padrão	0,3127	0,8006	0,7590	0,06717	1,118	0,3189
Erro padrão	0,1563	0,3580	0,3795	0,02375	0,6455	0,2255
$ERR\gamma$						
Número de amostras	4	5	5	8	3	2
Média por grupo	1,000	3,153	1,532	3,197	0,5734	0,07627
Desvio padrão	0,1163	5,455	2,934	7,842	0,9171	0,1052
Erro padrão	0,05815	2,439	1,312	2,773	0,5295	0,07437

Ctrl – controle; Ca cplx – carcinoma complexo; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca tbp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido

Quadro 24 – Distribuição da razão da expressão de ERR α , ERR β e ERR γ em função do grau histológico do tumor mamário. P > 0,05 ANOVA – São Paulo – 2014

	Grupos			
	Ctrl	GI	GII	GIII
ERRα				
Número de amostras	4	17	4	2
Média por grupo	1,000	0,9572	0,5841	5,800
Desvio padrão	0,1241	1,468	0,7010	8,172
Erro padrão	0,06204	0,3561	0,3505	5,778
ERRβ				
Número de amostras	4	16	4	2
Média por grupo	1,000	0,3353	0,7210	0,2292
Desvio padrão	0,3127	0,6051	1,022	0,3189
Erro padrão	0,1563	0,1513	0,5111	0,2255
ERRγ				
Número de amostras	4	17	4	2
Média por grupo	1,000	2,819	0,6997	0,07627
Desvio padrão	0,1163	6,079	0,7132	0,1052
Erro padrão	0,05815	1,474	0,3566	0,07437

Ctrl – controle, GI, GII, GIII – grau histológico 1, 2 e 3

Gráfico 42 - Representação gráfica do quociente da expressão dos tumores ($2^{\Delta Ct}$ alvo) para $ERR\alpha$, $ERR\beta$ e $ERR\gamma$ agrupados por tipo histológico (A, C e E) e tipo histológico (B, D, F) em função da expressão do grupo controle ($2^{\Delta Ct}$ ref). Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; * diferença significativa ($P < 0,05$ no pós-teste de Dunnett de múltipla comparação) entre o grupo Ctrl e o grupo marcado com o mesmo sinal; • refere-se a valor atípico (*outlier*); Ctrl – controle; Ca cplx – carcinoma complexo; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca ttp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido; GI – grau 1; GII – grau 2; GIII – grau 3 – São Paulo – 2014

Relação da expressão de $ERR\alpha$ vs controle

Relação da expressão de $ERR\alpha$ vs controle

Relação da expressão de $ERR\beta$ vs controle

Relação da expressão de $ERR\beta$ vs controle

Relação da expressão de $ERR\gamma$ vs controle

Relação da expressão de $ERR\gamma$ vs controle

Tendo em vista a proximidade funcional destes receptores com os receptores de estrógeno, verificou-se por meio do teste de correlação de Pearson a existência de correlação entre a expressão de cada receptor obtida por meio de PCR em tempo real entre eles e em função da marcação imunoistoquímica de $ER\alpha$. Não

houve correlação entre as expressões dos diferentes receptores relacionados ao receptor de estrógeno (ERR) e nem também entre estes e o receptor de estrógeno alfa (ER α). Quadro 25 demonstra estas observações.

Quadro 25 – Correlação de Pearson entre a expressão de RNAm dos três ERR α obtida por qPCR e a expressão de ERR α por imunistoquímica – São Paulo – 2014

	ER α IHC	ERR α RNAm	ERR β RNAm	ERR γ RNAm
ER α IHC <i>P</i>		-0.147 0.473	0.153 0.454	0.042 0.838
ERR α RNAm <i>P</i>	-0.147 0.473		0.182 0.373	0.221 0.277
ERR β RNAm <i>P</i>	0.153 0.454	0.182 0.373		-0.136 0.509
ERR γ RNAm <i>P</i>	0.042 0.221	0.221 0.277	-0.136 0.509	

FGFR2 constituiu-se em desafio, uma vez que sua marcação é citoplasmática e passível de ser confundida com marcação de fundo.

Sendo anticorpo de marcação citoplasmática, as células foram consideradas positivas quando apresentaram marcação granular intracitoplasmática típica, diferentemente da marcação observada no interstício e de fundo, conforme figura 10.

Figura 10 - Imagem fotográfica de marcação citoplasmática granular típica (setas) de FGFR2 – São Paulo – 2014

Figuras 11A e 11B e 11C exemplificam a marcação imunoistoquímica de FGFR2 em tecido mamário neoplásico.

Figura 11 - Imagens fotográficas de padrões de imunorreatividade de FGFR2 de lâminas de corte histológico de tecido neoplásico ou mamário, obtidas com câmara digital acoplada à ocular de microscópio de luz. Magnitude equivalente a 400x. – São Paulo – 2014

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental da FMVZ/USP

Fotomicrografias quando digitalizadas e manejadas por editores de texto perdem sua relação com a magnitude que originalmente a gerou. Por esta razão, não foi incluída barra de escala nas imagens

FGFR2 não diferiu em comportamento nos estudos imunoistoquímicos em relação aos marcadores BRCA2 e ER α , não apresentando, também, diferença significativa nas análises estatísticas às quais este biomarcador foi submetido, conforme pode ser observado nos quadros 26 e 27.

Quadro 26 – Avaliação da imunorreatividade de FGFR2 em função do tipo e grau histológico e em função do estadiamento clínico. *P* = significância no teste do Qui-quadrado; n = total de amostras – São Paulo – 2014

FGFR2	Imunorreatividade citoplasmática			
	positiva	negativa	<i>P</i>	<i>N</i>
Tipo histológico			0,6557	68
Benigno/lenn	4	8		
Carcinoma				
<i>complexo</i>	7	4		
<i>misto</i>	6	6		
<i>simples tubular</i>	11	8		
<i>túbulo-papilífero</i>	4	2		
<i>sólido</i>	5	3		
Grau			0,9339	56
1	23	17		
2	7	4		
3	3	2		
Estádio			0,09	60
I	10	3		
II	12	8		
III	6	10		
IV	5	2		
V	4	0		
CMSa			0,6704	68
HER2	1	0		
luminal A	30	28		
luminal B	4	2		
Triplo negativo	2	1		
CMGs			0,7107	68
HER2	1	0		
luminal A	24	20		
luminal B HER-	6	8		
luminal B HER+	4	2		
Triplo negativo	2	1		

Quadro 27 – Avaliação da imunorreatividade de FGFR2 em dos demais marcadores e das classificações CMSa e CMGS. *P* = significância no teste do Exato de Fischer; n = total de amostras – São Paulo – 2014

FGFR2	Imunorreatividade citoplasmática			
	positiva	negativa	<i>P</i>	N
ERα			1,000	68
Positivo	30	25		
negativo	7	6		
PR			1,000	68
Positivo	34	28		
negativo	3	3		
Ki67			0,2113	68
Positivo	17	9		
negativo	20	22		
HER2			0,5797	68
Positivo	5	2		
negativo	32	29		
BRCA2			0,7842	68
Positivo	28	22		
Negativo	9	9		
ERRα			1,000	60
Positivo	27	24		
Negativo	5	4		
GATA3			0,4108	68
Positivo	29	21		
negativo	8	10		

FGFR2, no entanto demonstrou significância na análise de sobrevida com *P* = 0,0352 no modelo de análise univariada de COX ($X^2 = 4,437$ GL 1) e *P* = 0,0449 no modelo de Kaplan-Meier, com médias de sobrevida de $34,2 \pm 1,8$ meses para animais com baixa expressão e $27,2 \pm 2,7$ meses com animais apresentando alta expressão deste marcador, conforme pode ser observado no gráfico 43 de Kaplan-Meier e sobrevida em função da expressão deste biomarcador.

Gráfico 43 - Curva de Kaplan-Meier de probabilidade de sobrevida em função da imunorreatividade do marcador tumoral FGFR2 considerando-se a data da mastectomia evento inicial e a morte por neoplasia mamária maligna evento final. Teste log-rank de Mantel-Cox: $P < 0,05$ $X^2 = 4,437$ GL 1. $n = 56$ animais – São Paulo – 2014

Sobrevida em função da imunorreatividade de FGFR2

A capacidade prognóstica de FGFR2 foi confrontada, em análise multivariada de Cox de riscos proporcionais ao desempenho dos marcadores ER α , PR, Ki67 e HER2, sem apresentar significância no modelo de ajuste global, com $P = 0,0941$, porém, guardando independência aos demais marcadores e fator prognóstico favorável para FGFR2 negativo (coeficiente de regressão negativo e $P = 0,0424$), conforme quadro 28.

Quadro 28 – Análise de riscos proporcionais de Cox (método “enter”) para a expressão de FGFR2 tendo como covariáveis em forma categórica ER α , PR, Ki67 e HER2. $P = 0,0941$, $n = 56$ animais – São Paulo – 2014

Covariável	b	EP	P	Exp(b)	95% IC de Exp(b)
FGFR2 negativo	-1,7079	0,8414	0,0424	0,1812	0,0351 a 0,9351
ERα negativo	0,8570	0,8308	0,3023	2,3561	0,4663 a 11,9059
PR negativo	0,6045	1,0562	0,5671	1,8303	0,2334 a 14,3546
Ki67 positivo	0,9716	0,6877	0,1577	2,6422	0,6911 a 10,1011
HER2 positivo	0,4127	0,8223	0,6157	1,5109	0,3040 a 7,5098

b = coeficiente de regressão beta

EP – erro padrão

Exp(b) = exponencial de beta

A análise multivariada considerando FGFR2 e grau histológico do tumor como covariáveis demonstrou significância no para o modelo de ajuste global, $P = 0,0004$ no modelo geral de ajuste com $P < 0,05$ e coeficiente de regressão negativo para

tumores FGFR2 negativos, indicativo de prognóstico favorável e grau histológico III, com coeficiente de regressão positivo, indicando prognóstico desfavorável para animais com tumores de grau III, conforme quadro 29

Quadro 29 – Análise de riscos proporcionais de Cox (método “enter”) para a expressão de FGFR2 tendo como covariável em forma categórica grau histológico do tumor. $P = 0,0004$, $n = 56$ animais – São Paulo – 2014

Covariável	B	EP	P	Exp(b)	95% IC de Exp(b)
FGFR2 negativo	-1,7713	0,8030	0,0274	0,1701	0,0355 to 0,8142
Grau I	1,000				
Grau II	-0,1954	0,8210	0,8119	0,8225	0,1659 to 4,0775
Grau III	3,0729	0,7927	0,0001	21,6050	4,6050 to 101,3625

Porém, sua capacidade prognóstica foi perdida quando o estadiamento clínico foi covariável de FGFR2, particularmente o estágio 5, com $P = 0,0005$ no modelo geral de ajuste na análise de riscos proporcionais de Cox ($P > 0,05$ para FGFR2 negativo), conforme quadro 30 que apresenta estes resultados.

Quadro 30 – Análise de riscos proporcionais de Cox (método “enter”) para a expressão de FGFR2 tendo como covariável em forma categórica grau histológico do tumor. $P = 0,0005$, $n = 56$ animais – São Paulo – 2014

Covariável	b	EP	P	Exp(b)	95% IC de Exp(b)
FGFR2 negativo	0,2520	1,3701	0,8541	1,2865	0,0889 to 18,6099
Estádio 1	1,3728	1,0590	0,1949	3,9463	0,5004 to 31,1206
Estádio 2	0,8342	1,1832	0,4808	2,3030	0,2292 to 23,1366
Estádio 3	5,5062	1,5704	0,0005	246,2239	11,5193 to 5263,0074
Estádio 4	-0,05221	1,0735	0,9612	0,9491	0,1170 to 7,6999
Estádio 5	4,6130	1,3030	0,0004	100,7854	7,9425 to 1278,9088

b = coeficiente de regressão beta

EP – erro padrão

Exp(b) = exponencial de beta

Embora alguns autores como Martin et al. (2011) preconizem que se considere também a marcação nuclear deste biomarcador, este estudo não encontrou significância estatística ou relevância de sua marcação nuclear em função de características clínicas dos animais e por isso, seus resultados não foram incluídos.

O último marcador deste estudo foi GATA3. As figuras 12A, 12B e 12C exemplificam apresentam o padrão imunoistoquímico de GATA3 em tecido mamário

neoplásico. Por se tratar de anticorpo policlonal, são esperadas reações inespecíficas com o interstício, como os demais anticorpos policlonais.

Figura 12 - Imagens fotográficas de padrões de imunorreatividade de GATA3 de lâminas de corte histológico de tecido neoplásico ou mamário, obtidas com câmara digital acoplada à ocular de microscópio de luz. Magnitude equivalente a 400x. – São Paulo – 2014

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental da FMVZ/USP

Fotomicrografias quando digitalizadas e manejadas por editores de texto perdem sua relação com a magnitude que originalmente a gerou. Por esta razão, não foi incluída barra de escala nas imagens

GATA3 como biomarcador apresentou significância em função do tipo histológico do tumor, com menor imunorreatividade associada aos tipos histológicos mais agressivos, com $P = 0,0244$ no teste Qui-quadrado, a exemplo de sua distribuição como variável contínua em função do tipo histológico do tumor.

Em função do grau histológico, GATA3 também apresentou significância estatística no teste do Qui-quadrado ($\chi^2 = 7,312$ GL 2) com $P = 0,0258$. Não apresentando, no entanto, significância em função dos demais parâmetros analisados, conforme demonstra os quadros 31 e 32.

Quadro 31 – Avaliação da imunorreatividade de GATA3 em função do tipo e grau histológico, estadiamento clínico e classificações CMSa e CMGs. P = significância no teste do Qui-quadrado; n = total de amostras – São Paulo – 2014

GATA3	Imunorreatividade nuclear			
	positiva	negativa	P	N
Tipo histológico			0,0244	68
Benigno/lenn	10	2		
Carcinoma				
<i>complexo</i>	9	2		
<i>misto</i>	11	1		
<i>simples tubular</i>	11	8		
<i>túbulo-papilífero</i>	6	0		
<i>sólido</i>	5	3		
Grau			0,0258	56
1	30	10		
2	9	2		
3	1	4		
Estádio			0,8567	60
I	10	3		
II	13	7		
III	13	3		
IV	5	2		
V	3	1		
CMSa			0,3679	68
HER2	0	1		
luminal A	44	14		
luminal B	4	2		
Triplo negativo	2	1		
CMGs			0,5020	68
HER2	0	1		
luminal A	34	10		
luminal B HER-	10	4		
luminal B HER+	4	2		
Triplo negativo	2	1		

Quadro 32 – Avaliação da imunorreatividade de GATA3 em função dos demais marcadores. P = significância no teste do Exato de Fischer; n = total de amostras – São Paulo – 2014

GATA3	Imunorreatividade nuclear			
	positiva	negativa	P	N
ERα			0,0898	68
positivo	43	12		
negativo	7	6		
PR			0,6515	68
positivo	46	16		
negativo	4	2		
Ki67			0,2667	68
positivo	17	9		
negativo	33	9		
HER2			0,3705	68
positivo	46	15		
negativo	4	3		
BRCA2			0,7612	68
positivo	36	14		
negativo	14	4		
ERRα			1,000	60
Positivo	38	13		
negativo	7	2		
FGFR2			0,4108	68
Positivo	29	8		
negativo	21	10		

Na análise de sobrevida em função da imunorreatividade de GATA3, obteve-se no teste de log-rank (Mantel-Cox) $P = 0,2221$ ($X^2 = 1,4909$ GL 1) com médias de sobrevida de $31,9 \pm 2,0$ meses para animais positivos e média de $24,0 \pm 2,9$ meses de sobrevida para animais negativos, conforme gráfico 44 que apresenta a curva de Kaplan-Meier de sobrevida em para o limite de corte conforme estabelecido na sessão 4.3.7.

Gráfico 44 - Curva de Kaplan-Meier de probabilidade de sobrevida em função da imunorreatividade do marcador tumoral GATA3 considerando-se a data da mastectomia evento inicial e a morte por neoplasia mamária maligna evento final. Teste log-rank de Mantel-Cox: $P > 0,05$ $X^2 = 1,4909$ GL 1. n = 56 animais – São Paulo – 2014

Sobrevida em função da imunorreatividade de GATA-3

Quando avaliada como variável contínua e em função do tipo histológico, a média dos escores de imunorreatividade de GATA3 apresentou diferença significativa entre os grupos, com $P = 0,0393$ para 95% IC na análise de variância, porém, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos no pós-teste de Tukey de múltipla comparação, nem entre o grupo controle e os demais grupos, no pós-teste de Dunnett de múltipla comparação.

O quadro 33 e o gráfico 45 apresentam a distribuição da imunorreatividade de GATA3 como variável contínua e em função do tipo histológico do tumor.

Quadro 33 – Avaliação da imunorreatividade de GATA3 em função do tipo histológico. ANOVA – São Paulo – 2014

GATA-3	Grupos					
	Ctrl	Ca cplx	Ca mst	Ca spl	Ca tbp	Ca sld
Número de amostras	12	11	12	19	6	8
Escore mínimo	53,00	46,00	76,00	32,00	117,0	41,00
25% Percentil	106,0	129,0	118,8	84,00	137,3	49,50
Mediana	135,5	139,0	154,5	116,0	147,5	92,50
75% Percentil	163,3	198,0	167,3	148,0	183,5	153,8
Escore máximo	176,0	242,0	186,0	167,0	224,0	178,0
Média por grupo	128,3	147,1	143,5	113,8	158,3	99,88
Desvio padrão	37,69	59,79	31,53	36,15	36,32	51,49
Erro padrão	10,88	18,03	9,102	8,294	14,83	18,20
95% IC inferior	104,4	106,9	123,5	96,42	120,2	56,83
95% IC superior	152,3	187,3	163,5	131,3	196,5	142,9

Ctrl – controle; Ca cplx – carcinoma complexo; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca tbp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido

Gráfico 45 – Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade de GATA3 em forma de variável contínua (porcentagem de células imunorreativas em relação ao total de células contadas pelo método HSCORE), agrupados em função do tipo histológico tumoral. Média do grupo controle (Ctrl) $128,3 \pm 37,69$ $P < 0,05$ IC de 95% ANOVA. Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; * diferença significativa ($P < 0,05$ no pós-teste de Dunnett de múltipla comparação) entre o grupo Ctrl e o grupo marcado com o mesmo sinal; Ctrl – controle; Ca cplx – carcinoma complexo; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca tbp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido; $n = 78$ amostras tumorais – São Paulo – 2014

Porém, em função do grau histológico do tumor, a expressão de GATA3 por imunoistoquímica apresentou diferença estatística significativa tanto na análise de

variância quanto no pós-teste de Dunnett de múltipla comparação entre os grupos controle e grau 3 e entre os grupos de grau 1 e 3 e graus 2 e 3 no pós-teste de Tukey de múltipla comparação com $P = 0,0102$ para 95% IC ANOVA.

O quadro 34 e o gráfico 46 apresentam os dados acima descritos.

Quadro 34 – Avaliação da imunorreatividade de GATA3 em função do grau histológico. ANOVA – São Paulo – 2014

	Grupos			
	Ctrl	GI	GII	GIII
Número de amostras	40	11	5	12
Escore mínimo	32,00	89,00	41,00	53,00
25% Percentil	100,5	129,0	42,00	106,0
Mediana	138,0	147,0	69,00	135,5
75% Percentil	164,0	178,0	106,5	163,3
Escore máximo	216,0	242,0	117,0	176,0
Média por grupo	130,4	152,0	73,20	128,3
Desvio padrão	42,20	47,41	33,18	37,69
Erro padrão	6,673	14,29	14,84	10,88
95% IC inferior	116,9	120,2	32,00	104,4
95% IC superior	143,8	183,8	114,4	152,3

Gráfico 46 – Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade de GATA3 em forma de variável contínua (porcentagem de células imunorreativas em relação ao total de células contadas pelo método HSCORE), agrupados em função do grau histológico tumoral. Média do grupo controle (Ctrl) $130,4 \pm 42,2$ $P = 0,0102$ IC de 95% ANOVA. Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; * diferença significativa ($P < 0,05$ no pós-teste de Dunnett de múltipla comparação) entre o grupo Ctrl e o grupo marcado com o mesmo sinal. Ctrl – controle, GI, GII, GIII – grau histológico 1, 2 e 3; $n = 78$ amostras tumorais – São Paulo – 2014

Tendo em vista a relação apontada entre GATA3 e tumores luminais decidiu-se avaliar a imunorreatividade de GATA3 como escore contínuo nos tumores agrupados por seu escore de ER α , em categoria positivo ou negativo. Uma vez que este modelo matemático apresentou significância estatística, o escore de imunorreatividade de GATA3 foi avaliado em função do agrupamento dos tumores determinado pelo escore categorizado dos demais marcadores.

A imunorreatividade de GATA3 em forma de escore contínuo quando comparada aos marcadores demais marcadores na forma categórica, apresentou médias com diferença significativa no teste t de Student para ER α e FGFR2.

Em função de ER α , a diferença entre as médias da expressão de GATA3 apresentou significância, com média de $104,8 \pm 38,8$ para tumores também ER α negativos e $135,1 \pm 44,45$ para tumores ER α positivos com $P = 0,0269$ para 95%IC conforme apresentado no gráfico 47.

Gráfico 47 – Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade de GATA3 em forma de variável contínua (porcentagem de células imunorreativas em relação ao total de células contadas pelo método HSCORE) em função da pontuação dos tumores por ER α , $P < 0,05$ teste t de Student; ER α + - tumores positivos para receptor de estrógeno; ER α - tumores negativos para receptor de estrógeno; ER α - – São Paulo – 2014

Quando a expressão imunoistoquímica de GATA3 agrupada em função do escore de marcação de FGFR2 de forma dicotomizada, a média da imunorreatividade de GATA-3 para tumores com alta expressão de FGFR2 foi de $139,2 \pm 45,6$ e para os tumores com baixa expressão de FGFR2 foi de $117,5 \pm 41,1$, com $P = 0,0455$ para 95% IC no teste t de Student, conforme pode ser observado no gráfico 48.

Gráfico 48 – Representação gráfica da distribuição dos escores de imunorreatividade de GATA3 em forma de variável contínua (porcentagem de células imunorreativas em relação ao total de células contadas pelo método HSCORE) em função da pontuação dos tumores por FGFR2. $P < 0,05$ teste t de Student; FGFR2+ - tumores positivos para FGFR2; ER α - tumores negativos FGFR2 – São Paulo – 2014

Buscando compreender a interação entre as expressões de GATA3 e FGFR2, os escores destes marcadores foram submetidos ao modelo de regressão de Cox de riscos proporcionais, onde foi possível de se observar que FGFR2 mantém seu valor prognóstico com $P = 0,0485$ e coeficiente de regressão negativo para baixa expressão de FGFR2, indicativo de bom prognóstico e coeficiente de regressão positivo para GATA3 negativo, indicativo de mau prognóstico, conforme quadro 35, contrariando o achado de maior expressão de GATA3 em tumores FGFR2 positivos.

Quadro 35 – Análise de riscos proporcionais de Cox (método “enter”) para a expressão de GATA 3 e FGFR2 como covariáveis em forma categórica, $n = 56$ animais – São Paulo – 2014

Covariável	b	EP	P	Exp(b)	95% IC de Exp(b)
FGFR2 negativo	-1,5374	0,7793	0,0485	0,2149	0,0470 a 0,9824
GATA3 negativo	0,8849	0,5934	0,1359	2,4228	0,7617 a 7,7061

b = coeficiente de regressão beta

EP – erro padrão

Exp(b) = exponencial de beta

Para GATA3, as análises estatísticas da expressão de RNAm em função do tipo e grau histológico por meio de análise de variância também não apresentaram diferença estatística significativa, com $P = 0,6751$ para 95% IC na avaliação da expressão de RNAm de GATA-3 em função do tipo histológico e $P = 0,9035$ para 95% IC em função do grau histológico. Em ambos os modelos, não houve significância no pós-teste de Dunnett de múltipla comparação, embora corroborem os resultados obtidos nos estudos imunoistoquímicos com este marcador, apresentando maior expressão nos tumores do tipo carcinoma complexo e misto em tumor benigno, cujas médias se situaram entre três e quatro vezes a expressão do grupo controle. Os quadros 36 e 37 e os gráficos 49 e 50 sumarizam os resultados obtidos no estudo da expressão de RNAm de GATA3.

Quadro 36 – Distribuição da razão da expressão de GATA3 em função do grupo controle e tipo histológico do tumor mamário. $P > 0,05$ ANOVA – São Paulo – 2014

GATA3	Grupos					
	Ctrl	Ca cplx	Ca MST	Ca spl	Ca tbp	Ca sld
Número de amostras	4	5	5	8	3	2
Média por grupo	1,000	3,067	3,869	0,2685	0,7336	1,739
Desvio padrão	0,3323	5,572	7,502	0,3159	0,6203	2,415
Erro padrão	0,1661	2,492	3,355	0,1117	0,3581	1,708

Ctrl – controle; Ca cplx – carcinoma complexo; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca tbp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido

Quadro 37 – Distribuição da razão da expressão de GATA3 em função do grupo controle e do grau histológico do tumor mamário. $P > 0,05$ ANOVA – São Paulo – 2014

GATA3	Grupos			
	Ctrl	GI	GII	GIII
Número de amostras	4	17	4	2
Média por grupo	1,000	2,146	0,6383	1,739
Desvio padrão	0,3323	4,963	0,5369	2,415
Erro padrão	0,1661	1,204	0,2684	1,708

Ctrl – controle, GI, GII, GIII – grau histológico 1, 2 e 3

Gráfico 49 - Representação gráfica do quociente da expressão dos tumores ($2^{\Delta Ct}$ alvo) para GATA3 agrupados por tipo histológico e em função da expressão do grupo controle ($2^{\Delta Ct}$ controle). Média do grupo controle (Ctrl) $1,00 \pm 0,3323$ $P > 0,05$ IC de 95% ANOVA. Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; * diferença significativa ($P < 0,05$ no pós-teste de Dunnett de múltipla comparação) entre o grupo Ctrl e o grupo marcado com o mesmo sinal; • refere-se a valor atípico (*outlier*); Ctrl – controle; Ca cplx – carcinoma complexo; Ca mst – carcinoma misto; Ca spl – carcinoma simples tubular; Ca tbp – carcinoma simples túbulo-papilífero; Ca sld – carcinoma sólido; n = 27 amostras tumorais – São Paulo – 2014

Relação da expressão de GATA3 vs controle

Gráfico 50 - Representação gráfica do quociente da expressão dos tumores ($[\Delta Ct]$) para BRCA1 agrupados por grau histológico e em função da expressão do grupo controle. Média do grupo controle (Ctrl) $1,00 \pm 0,1843$ $P < 0,0001$ IC de 95% ANOVA. Na representação em boxplot de Tuckey, a caixa representa os percentis de 25 a 75%, a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os limites superior e inferior do intervalo de confiança; * refere diferença significativa no pós-teste de Dunnett de múltipla comparação entre o grupo Ctrl e o grupo marcado com o mesmo sinal; • refere-se a valor atípico (*outlier*). N = 25 amostras tumorais; Ctrl – controle; GI – grau 1; GII – grau 2; GIII – grau 3 – São Paulo – 2014

Relação da expressão de GATA3 vs controle

Também GATA3 teve a expressão de RNAm obtida por qPCR comparada com a imunorreatividade obtida por estudo imunoistoquímico, mediante teste de correlação de Pearson e Spearman não apresentando, no entanto, significância estatística, com $r = -0,07024$, $r^2 = 0,00493$ e $P = 0,7331$ no teste de correlação de Pearson, conforme pode ser observado no gráfico 51.

Gráfico 51 - Representação gráfica da correlação entre os escores de BRCA2 obtidos por imunoistoquímica e da expressão deste marcador obtida por meio de PCR em tempo real. $r = -0,07024$ e $r^2 = 0,00493$ com $P = 0,7331$ e IC 95% - Coeficiente de Correlação de Pearson. $n = 26$ – São Paulo – 2014

4.5 DISCUSSÃO

A utilização dos marcadores tumorais na clínica médica é prática corrente em Medicina e vem ganhando espaço também em Medicina Veterinária. A busca por marcadores que apresentem alta especificidade e sensibilidade motiva estudos em busca de novas moléculas com fim diagnóstico.

Este trabalho demonstra, de forma inédita, o comportamento de GATA3 e FGFR2 nas neoplasias mamárias caninas e indica uma possível interação entre estes marcadores.

Nos estudos imunoistoquímicos dos marcadores propostos, quando analisados como variável contínua, ou seja, em função do escore obtido por cada tumor, foi possível observar que GATA3 apresentou resultados com significância

estatística em função do tipo e grau histológico dos tumores, com médias de escore mais elevadas entre os tumores de grau I e II e média de escore menor nos tumores de grau III.

Observação semelhante ocorreu quando da distribuição dos escores em função do tipo histológico e em função da expressão de RNAm de GATA3 na técnica de qPCR, ainda que não tenha havido significância estatística. Estas observações estão em conformidade com o relato de Yoon et al. (2009) que estudando a expressão de GATA3 por meio de marcação imunoistoquímica em 242 casos de neoplasias mamárias na mulher, observaram a diminuição de sua expressão em função do grau histológico do tumor, à exemplo de Voduc, Cheang e Nilesen (2008) que conduziram trabalho semelhante. No entanto, GATA3 não mostrou relação com estadiamento clínico, classificação molecular tumores em subtipos ou com os demais marcadores. Estes resultados estão, em parte, em concordância com o relato de Tominaga et al. (2012) que, estudando 130 casos de neoplasia mamária na mulher, não encontraram significância na interação entre GATA3, estadiamento clínico, comprometimento de linfonodos e marcação por HER2, porém, observaram diferença significativa na marcação de GATA3 em função de marcadores como ER α , PR e Ki67.

Sabe-se que uma das funções de GATA3 no epitélio mamário está relacionada à manutenção da diferenciação das células epiteliais, particularmente das células secretoras luminais. Na mulher, durante cada ocorrência de gestação, lactação e involução das glândulas mamárias o tecido mamário sofre mudanças morfológicas que incluem proliferação celular, diferenciação e apoptose. Neste sentido, GATA3 é um importante agente orquestrador destas mudanças, ao determinar o destino das células luminais durante a mamogênese (FANG; CHEN; WEIGEL, 2009). Com o propósito de estudar a capacidade indutora de diferenciação de GATA3 e sua habilidade em reprimir a disseminação de tumores mamários, Kouros-Mehr et al. (2008) estudaram culturas de carcinomas murinos infectadas com retrovírus vazios ou contendo clone de GATA3 de camundongos, transplantadas no tecido adiposo, livre de glândulas mamárias, em camundongos selvagens. Após seis semanas, os autores observaram carcinomas indiferenciados e sem estrutura ductal nos tumores provenientes de células infectadas com retrovírus vazios. Contrariamente, tumores provenientes de células portadoras de GATA3 apresentaram tumores funcionalmente diferenciados e possuíam 27 vezes menos

propensão à formação de metástase, demonstrando a participação de GATA3 na diferenciação celular e contenção do fenótipo metastático. No entanto, neste trabalho, a maioria dos animais com metástase pulmonar se apresentaram com GATA3 positivo (3 em 4) e de sete animais linfonodo positivo, apenas 2 apresentaram escore de GATA3 negativo. É possível que o efeito protetor de GATA3 possa ser facilmente suplantado por outros mecanismos na célula neoplásica.

Embora neste trabalho o agrupamento dos tumores em GATA3 positivos e negativos simultaneamente com a marcação de receptores de estrógeno, também em categorias, não tenha apontado significância estatística, o agrupamento dos escores de GATA3 como variável continua em função do receptor de estrógeno nos tumores caninos estudados, também mostraram relação com a presença de marcação para este receptor, a exemplo do que ocorre na mulher, demonstrando sua participação na diferenciação luminal, uma vez que foi observado média dos escores de GATA3 nos tumores estrógeno negativo mais baixa que aquela dos tumores positivos.

De fato, GATA3 e ER α têm sido correlacionados em vários relatos às células luminais diferenciadas. Em estudo de metanálise baseado no banco de dados *Oncomine*, focado para os relatos de câncer de mama, foi observado que tanto GATA3 quanto ER α dividem genes comuns em suas vias, como pS2, FOXA1, BCL2, ceratina 18 e cilkina D1. Do mesmo modo, em estudo que avaliou por imunoistoquímica a expressão de GATA3 e ER α em carcinomas mamários de 249 mulheres, observou-se forte relação entre tumores ER α e GATA3 positivos (WILSON; GIGUÈRE, 2008; ALBERGARIA et al., 2009).

No entanto, este relato não conseguiu demonstrar o valor prognóstico da expressão de GATA3 em cadelas, seja pelos estudos imunoistoquímicos, seja pelo estudo da expressão de RNAm por PCR, pois, ainda que a curva de sobrevida tenha demonstrado desfecho favorável às fêmeas GATA3 positivas, não houve significância estatística para sustentar esta observação, conflitando com o relato de Yoon et al. (2009), que avaliando a marcação imunoistoquímica em 242 casos de neoplasia mamária na mulher, demonstrou a que a expressão dicotomizada de GATA3 é um importante fator preditivo de evolução da doença. Contudo, em trabalho que envolveu 4.444 casos de câncer de mama na mulher e que avaliou a marcação imunoistoquímica de GATA3, os autores consideraram este marcador de

bom valor prognóstico, porém, que não guarda independência da expressão de ER α , pois, não demonstrou valor prognóstico em pacientes tratadas e não tratadas com tamoxifeno, um antiestrogênico, no subgrupo ER α positivo (VODUC; CHEANG; NIELSEN, 2008). De fato, quando o foco deste estudo recai sobre resultados obtidos dos animais portadores de metástase, GATA3 apresentou-se negativo em apenas um dos quatro animais, justamente o único ER α negativo do grupo e em apenas dois, dos sete animais com comprometimento nodal.

Este trabalho também demonstrou uma interação conflitante entre GATA3 e FGFR2, uma vez que a média do escore de expressão de GATA3 por imunohistoquímica quando agrupados em função da positividade ou não do tumor à marcação de FGFR2, foi superior nos tumores FGFR2 positivos.

Sendo a marcação de FGFR2 indicativa de pior prognóstico, fato este comprovado neste trabalho na análise de sobrevida dos animais em função da expressão de FGFR2 por imunohistoquímica, e sendo a presença de GATA3 um indicador de diferenciação e de melhor prognóstico, seria esperado que a expressão de ambos os marcadores se apresentassem com comportamento inverso entre si. Utilizando-se de ferramentas de busca, não foi encontrado relato que relacionasse a marcação imunohistoquímica de ambos os marcadores. Na verdade, um único estudo que avaliou a interação entre FGFR2 e GATA3, avaliando a ocorrência de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) no íntron de FGFR2 e a interação deste gene com fatores de transcrição apontou, por meio de algoritmos que analisaram 2000 perfis de transcrição, que GATA3, juntamente com FOX1, ER α e PTTG1, fazem parte de uma rede de reguladores mestres das vias de sinalização de FGFR2, contribuindo na sinalização dos genes de suscetibilidade do câncer de mama (FLETCHER et al., 2013). Esta interação ganha maior interesse quando se observa a marcação positiva para FGFR2 em todos os animais portadores de metástase pulmonar, sejam eles GATA3 negativos ou não, sugerindo independência de FGFR2 em função de GATA3. De fato, quando ambos os marcadores foram submetidos à análise de riscos proporcionais de Cox, FGFR2 manteve seu valor prognóstico, não perdendo significância estatística.

FGFR2, por sua vez, demonstrou valor prognóstico de sobrevida, na análise de log-rank e curva de Kaplan-Meier, assim como nas análises univariada e multivariada de riscos proporcionais de Cox, quando confrontado com os demais marcadores e com grau histológico, porém, particularmente em função do estágio 5,

representado pelos animais com metástase pulmonar, FGFR2 perdeu sua capacidade prognóstica, demonstrando que a presença de metástase pulmonar possui maior peso prognóstico que a baixa expressão de FGFR2. Estes achados estão em conformidade com estudo que investigou a expressão de FGFR2 por imunoistoquímica e no qual foram avaliadas 125 amostras de carcinoma ductal invasivo de grau 2 em mulheres. A marcação citoplasmática de FGFR2 mostrou-se fator prognóstico independente em análise multivariada, tanto para sobrevida quanto para período livre da doença, quando se considerou como covariáveis idade, tamanho do tumor, estadiamento, invasão nodal e marcação por ER α , PR e HER2 (SUN et al., 2012).

Por este trabalho ter se restringido ao estudo das neoplasias mamárias esporádicas em fêmeas da espécie canina, a falta de informações sobre os antecedentes familiares e a baixa representatividade de algumas raças na população estudada não permitiram qualquer inferência em relação à hereditariedade e à expressão de BRCA1 e BRCA2 caninos, genes que na mulher, têm importante implicação no câncer hereditário.

São poucos os relatos de expressão de BRCA1 por estudo imunoistoquímico em tecido mamário de cadelas. Nieto et al. (2003) relatam o sucesso na marcação de BRCA1 em tecido mamário displásico e neoplásico fixados em formalina e conservados em parafina. À semelhança deste relato, os autores também utilizaram tampão citrato e panela de pressão para recuperação antigênica. No entanto, este experimento não obteve êxito com o anticorpo utilizado para este marcador, possivelmente pela origem diferente de fabricação dos anticorpos entre estes dois relatos.

Dos estudos imunoistoquímicos da expressão de BRCA2, não se obteve significância estatística que apontasse relação entre este marcador, o tipo e grau histológico do tumor, estadiamento clínico ou em relação aos demais marcadores em estudo. Da mesma forma, a tentativa de correlacionar a expressão de BRCA2 em estudo imunoistoquímico com a avaliação da expressão de RNAm deste marcador não demonstrou significância. É possível que BRCA2 não seja realmente um marcador que possua aplicação clínica. Na mulher os interesses se concentram nas mutações e na avaliação da superexpressão deste gene por qPCR, quando alvo de mutação. Em um estudo que avaliou a expressão de RNAm de BRCA2 em 127 neoplasias esporádicas de mama, os autores observaram amplas faixas de

expressão, com valores variando da sub a superexpressão, independentemente do tipo histológico de tumor estudado e não conseguiram relacionar a expressão de BRCA2 por qPCR à sobrevida ou à recidiva da doença, a exemplo deste trabalho (BIÈCHE; NOGUÈS; LIDEREAU, 1999). Por outro lado, dentre os poucos relatos que estudaram a expressão de BRCA2 por ensaio imunoistoquímico, foi desenvolvido um sistema de detecção imunoistoquímica especificamente para a porção mutante de BRCA2, utilizando-se anticorpos anti-porção N-terminal e C-terminal de sua proteína, em busca de proteínas truncadas, eliminando a necessidade de amplificação de DNA ou manipulação genética. Neste estudo, o sistema foi capaz de diferenciar a marcação de pacientes portadoras de tumores com mutação de BRCA2, que não expressam a porção C-terminal, daquelas com neoplasia mamária esporádica, que expressam a proteína intacta (WATSON et al., 2009).

No entanto, o estudo da expressão de BRCA1 por qPCR demonstrou significância em função dos diferentes tipos e graus de tumores, em relação ao tecido mamário de controle, o mesmo sendo observado para a expressão de BRCA2 em função do grau histológico e, embora sem significância estatística, as médias da expressão de BRCA2 também se apresentaram abaixo da média do grupo controle, demonstrando a perda de expressão destes genes supressores de tumor nas neoplasias malignas, tanto em função do tipo histológico do tumor quanto em função de seu grau. Estes dados conflitam com os relatos de Klopffleisch e Gruber (2009) que estudando a expressão de RNAm de BRCA1, BRCA2 e RAD51 em adenomas e adenocarcinomas mamários caninos utilizando-se de PCR em tempo real, observaram a redução da expressão de RNAm de BRCA1 e BRCA2 em adenomas. Em carcinomas mamários, estes autores observaram expressão aumentada de BRCA1 em 3 de 10 animais, sem alteração nas demais amostras e superexpressão de BRCA2 em 50% das amostras. Porém, os achados deste trabalho para a expressão de RNAm de BRCA1 estão em conformidade com os relatos de Nieto et al. (2003) que encontraram perda progressiva da marcação de BRCA1 nos estudos imunoistoquímicos, em função do tipo histológico de tecido mamário, do tecido normal ao neoplásico de maior malignidade. Também está de acordo com os relatos deste tipo de estudo na mulher, onde a perda da expressão de BRCA1 em neoplasias mamárias de ocorrência esporádica foi associada ao câncer invasivo, de pior prognóstico e cuja expressão de RNAm de BRCA1 apresentou-se entre valores

indetectáveis a 0,5 vezes aquela demonstrada por tecido mamário normal (THOMPSON et al., 1995). Tendo em vista a homologia de 80% entre o gene BRCA1 humano e o gene canino, pode-se inferir que esta premissa é verdadeira para as neoplasias mamárias nos cães (SZABO et al., 1996).

De fato, BRCA1 é considerado um gene supressor de tumor que regula negativamente a proliferação celular e positivamente a morte celular programada (apoptose) estando a perda de ambos de seus alelos associada à transformação maligna. Embora estas mutações estejam associadas ao câncer hereditário, a perda de BRCA1 também é observada no câncer esporádico na mulher, ainda que mais raramente (AMENDOLA; VIEIRA, 2005). Assim como em Medicina, as mutações em BRCA1 assumem maior importância no estudo das neoplasias mamárias caninas, a exemplo do relato de estudo que avaliou em fêmeas da raça English springer spaniel a expressão de dez diferentes genes considerados de suscetibilidade ao câncer de mama na mulher, dentre eles BRCA1 e BRCA2, observando, por meio de genotipagem e estudo de SNPs, que ambos os genes, mas, especialmente BRCA1 tem suas mutações associadas às neoplasias malignas (RIVERA et al., 2009).

Dos estudos dos receptores relacionados ao receptor de estrógeno apenas ER γ , embora sem significância estatística, apresentou coerência com o tipo e o grau histológico tumoral, com menor expressão gradativa em função do tipo e grau histológicos .

Chama a atenção, no entanto, o comportamento de ERR α , que apresentou superexpressão no grupo de carcinoma sólido e de grau 3, sobre a forte influência da expressão de RNAm do tumor com diagnóstico de comedocarcinoma, cuja expressão de ERR α foi onze vezes maior daquela do grupo controle.

A importância de ERRs no câncer de mama humano foi estudada pela comparação de seus perfis de RNAm com indicadores estabelecidos clinicamente e com os perfis de expressão de RNAm dos receptores de estrógeno e dos membros da família ErbB. Aparentemente, ERR α pode ser um importante marcador de prognóstico desfavorável em uma proporção significativa de pacientes com câncer de mama, uma vez que tumores contendo altos níveis de ERR α foram correlacionados com insensibilidade hormonal e marcação negativa para receptor de esteróide, a exemplo desta amostra tumoral. Em adição, ERR α parece emergir como um receptor com participação na carcinogênese de cólon, pois mudanças na expressão do RNAm de ERR α estão associadas com progressão tumoral e

diferentes estágios histopatológicos deste tipo de neoplasia (ARIAZI; JORDAN, 2006; CAVALLINI et al., 2005).

Utilizando-se de PCR quantitativo em tempo real, os níveis absolutos de RNAm de ER α , ER β , ERR α , ERR β e ERR γ foram determinados em neoplasias de mama primárias e células epiteliais mamárias normais derivadas de reduções mamoplásticas. Em células epiteliais mamárias normais, os autores encontraram níveis de RNAm de ER α e ERR α equivalentes e até mais abundantes que os demais receptores nucleares avaliados. Em cânceres primários de mama ER positivo, somente níveis de RNAm de ER α encontravam-se mais elevados do que os níveis de RNAm de ERR α , enquanto que em tumores ER negativo a expressão de RNAm de ERR α encontrava-se mais elevada. Neste mesmo estudo os autores verificaram que os níveis de RNAm de ERR α estavam correlacionados com os níveis de ER β em células epiteliais mamárias normais e com ER α de neoplasias primárias de mama, observando, também, a expressão de ERR α como fator prognóstico desfavorável em neoplasias mamárias humanas (ARIAZI; JORDAN, 2006).

Suzuki et al. (2004) também investigaram a expressão de ERR α em neoplasias mamárias pelo uso de imunohistoquímica. Os autores observaram que a proteína ERR α era expressa no núcleo de 55% das neoplasias mamárias. Curiosamente enquanto associação significativa foi observada na maioria dos tumores de mama, entre pS2, um gene que codifica a síntese de elementos responsivos ao estrógeno (ERR) e ER α , esta associação encontrava-se ausente no subgrupo de tumores ERR α positivos, sugerindo que ERR α subverteu a regulação mediada por ER α em pS2. Por outro lado, os estudos de sobrevida em função da imunomarcagem de ERR α demonstraram maior risco relativo de recidiva e pior evolução clínica nas pacientes ERR α positivas, indicando ERR α como marcador de prognóstico desfavorável.

Em Medicina Veterinária o estudo dos ERR parece estar restrito ao desenvolvimento da glândula mamária em bovinos onde a expressão de ER α , PR, ERR α e ERR β foi avaliada por qPCR e imunoistoquímica em bezerras e vacas em diferentes estágios reprodutivos e de lactação. Níveis elevados de ERR α , ER α e PR foram observados em todas as fases fisiológicas da glândula mamária em bovinos, contrastando com níveis muito baixos de expressão de ERR β , sugerindo uma regulação comum entre os três primeiros receptores nucleares na fisiologia da glândula mamária (CONNOR et al., 2005).

4.6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível caracterizar o comportamento de biomarcadores que ainda não foram objeto de estudo em neoplasias mamárias caninas como GATA3, FGFR2 e $ERR\alpha$ e demonstrar suas diferenças em relação aos estudos conduzidos em seres humanos ao apontar, a exemplo do que ocorre nas neoplasias mamárias na mulher, que GATA3 guarda relação com tipo e grau histológico e com as vias do receptor de estrógeno alfa, porém, com comportamento adverso em relação a FGFR2.

Este trabalho demonstra, também, que FGRF2 possui valor prognóstico significativo e independente na previsão de sobrevida nas fêmeas da espécie canina portadoras de neoplasia mamária.

Este trabalho, demonstrou, também, que a expressão de RNAm de BRCA1 guarda relação com o tipo e grau histológico do tumor podendo, assim, representar importante ferramenta no estudo das alterações de BRCA1 não hereditárias.

Vistas em conjunto, as características destes marcadores podem ser utilizadas como ferramentas úteis no estudo do câncer de mama, tanto nas fêmeas caninas como na mulher, caracterizando-se em interessante modelo translacional.

REFERÊNCIAS

- ALBERGARIA, A.; PAREDES, J.; SOUSA, B.; MILANEZI, F.; CARNEIRO, V.; BASTOS, J.; COSTA, S.; VIEIRA, D.; LOPES, N.; LAM, E. W.; LUNET, N.; SCHMITT, F. Expression of FOXA1 and GATA-3 in breast cancer: the prognostic significance in hormone receptor-negative tumours. **Breast Cancer Research : BCR**, v. 11, n. 3, R40, 2009.
- AMENDOLA, L. C. B.; VIEIRA, R. A contribuição dos genes BRCA na predisposição hereditária ao câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 4, p. 325-330, 2005.
- ARIAZI, E. A.; JORDAN, V. C. Estrogen-related receptors as emerging targets in cancer and metabolic disorders. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 3, p. 203–215, 2006.
- BIÈCHE, I.; NOGUÈS, C.; LIDEREAU, R. Overexpression of BRCA2 gene in sporadic breast tumours. **Oncogene**, v. 18, n. 37, p. 5232–5238, 1999.
- CASSALI, G. D.; LAVALLE, G. E.; DE NARDI, A. B.; FERREIRA, E.; BERTAGNOLLI, A. C.; ESTRELA-LIMA, A.; ALESSI, A. C.; DALECK, C. R.; SALGADO, B. S.; FERNANDES, C. G.; SOBRAL, R. A.; AMORIM, R. L.; GAMBA, C. O.; DAMASCENO, K. A.; AULER, P. A.; MAGALHÃES, G. M.; SILVA, J. O.; RAPOSO, J. B.; FERREIRA, A. M. R.; OLIVEIRA, L. O.; MALM, C.; ZUCCARI, D. A. P. C.; TANAKA, N. M.; RIBEIRO, L. R.; CAMPOS, L. C.; SOUZA, C. M.; LEITE, J. S.; SOARES, L. M. C.; CAVALCANTI, M. F.; FONTELES, Z. G. C.; SCHUCH, I. D.; PANIAGO, J.; OLIVEIRA, T. S.; TERRA, E. M.; CASTANHEIRA, T. L. L.; FELIX, A. O. C.; CARVALHO, G. D.; GUIM, T. N.; GUIM, T. N.; GARRIDO, E.; FERNANDES, S. C.; MAIA, F. C. L.; DAGLI, M. L. Z.; ROCHA, N. S.; FUKUMASU, H.; GRANDI, F.; MACHADO, J. P.; SILVA, S. M. M. S.; BEZERRI, J. E.; FREHSE, M. S.; PAES DE ALMEIDA, E. C.; CAMPUS, C. B. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 4, p. 153-180, 2011.
- CAVALLINI, A.; NOTARNICOLA, M.; GIANNINI, R.; MONTEMURRO, S.; LORUSSO, D.; VISCONTI, A.; MINERVINI, F.; CARUSO, M. G. Oestrogen receptor-related receptor alpha (ERR α) and oestrogen receptors (ER α and ER β) exhibit different gene expression in human colorectal tumor progression. **European Journal of Cancer**, v. 41, p. 1487-1494, 2005.
- CERLIANI, J. P.; VANZULLI, S. I.; PIÑERO, C. P.; BOTTINO, M. C.; SAHORES, A.; NUÑEZ, M.; VARCHETTA, R.; MARTINS, R.; ZEITLIN, E.; HEWITT, S. M.; MOLINOLO, A. A.; LANARI, C.; LAMB, C. A. Associated expressions of FGFR-2 and FGFR-3: from mouse mammary gland physiology to human breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 133, n. 3, p. 997–1008, 2012.
- CHOU, J.; PROVOT, S.; WERB, Z. GATA3 in development and cancer differentiation: Cells GATA have it! **Journal of Cellular Physiology**, v. 222, n. 1, p. 42-49, 2010.

CONNOR, E. E.; WOOD, D. L.; SONSTEGARD, T. S.; MOTA, A. F.; BENNETT, G. L.; WILLIAMS, J. L.; CAPUCO, A. V. Chromosomal mapping and quantitative analysis of estrogen-related receptor alpha-1, estrogen receptors alpha and beta and progesterone receptor in the bovine mammary gland. **The Journal of Endocrinology**, v. 185, n. 3, p. 593–603, 2005.

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

FANG, S. H.; CHEN, Y.; WEIGEL, R. J. GATA-3 as a marker of hormone response in breast cancer. **Journal of Surgical Research**, v. 157, p. 290–295, 2009.

FLETCHER, M. N. C.; CASTRO, M. A. A.; WANG, X.; SANTIAGO, I.; O'REILLY, M. O.; CHIN, S. F.; RUEDA, O. M.; CALDAS, C.; PONDER, B. A. J.; MARKOWETZ, F.; MEYER, K. B. Master regulators of FGFR2 signaling and breast cancer risk. **Nature Communications**, v. 4, p. 1-12, 2013.

GAMA, A.; ALVES, A.; SCHMITT, F. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. **Virchows Archives**, v. 453, p. 123-132, 2008.

GOLDHIRSCH, A.; WOOD, W. C.; COATES, A. S.; GELBER, R. D.; THÜRLIMANN, B.; SENN, H. J. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. **Annals of Oncology**, v. 22, n. 8, p. 1736–47, 2011.

GOLDSCHMIDT, M.; PEÑA, R.; RASOTTO, R.; ZAPULLI, V. Classification and Grading of Canine Mammary Gland Tumors. **Veterinary Pathology**, v. 48, p. 117, 2011. Disponível em: <<http://vet.sagepub.com/content/48/1/117>>. Acesso em: nov. 2013.

HSU, W. L.; HUANG, Y. H.; CHANG, T. J.; WONG, M. L.; CHANG, S. C. Single nucleotide variation in exon 11 of canine BRCA2 in healthy and cancerous mammary tissue. **The Veterinary Journal**, v. 184, p. 351–356, 2010.

JARZABEK, K.; KODA, M.; KOZLOWSKI, L.; SULKOWSKI, S.; KOTTLER, M. L.; WOLCZYNSKI, S. The significance of the expression of ER α as a potential biomarker in breast cancer. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 113, n. 1-2, p. 127–33, 2009.

KLOPFLEISCH, R.; GRUBER, A. D. Increased expression of BRCA2 and RAD51 in lymph node metastases of canine mammary adenocarcinomas. **Veterinary Pathology**, v. 46, n. 3, p. 416–422, 2009.

KOUROS-MEHR, H.; BECHIS, S. K.; SLORACH, E. M.; LITTLEPAGE, L. M.; EGEHLAD, M.; EWALD, A. J.; PAI, S. Y.; HO, I. C.; WERB, Z. GATA-3 links tumor differentiation and dissemination in a luminal breast cancer model. **Cancer Cell**, v. 13, n. 2, p. 141-152, 2008.

KRAUS, R. J.; ARIAZI, E. A.; FARRELL, M. I.; MERTZ, J. E. Estrogen-related receptor $\alpha 1$ actively antagonizes estrogen receptor-regulated transcription in MCF-7 mammary cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 24826-24834, 2002.

NERURKAR, V. R.; CHITALE, A. R.; JALNAPURKAR, B. V.; NAIK, S. N.; LALITHA, V. S. Comparative pathology of canine mammary tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 101, p. 389-397, 1989.

NIETO, A.; PÉREZ-ALENZA, M. D.; DEL CASTILLO, N.; TABANERA, E.; CASTAÑO, M.; PEÑA, L. BRCA1 Expression in canine mammary dysplasias and tumours: relationship with prognostic variables. **Journal of Comparative Pathology**, v. 128, p. 260-268, 2003.

NAYLOR, M. J.; ORMADY, C. J. GATA-3 and mammary gland fate. **Breast Cancer Research**, v. 9, n. 302, p. 1-2, 2007.

RAMOS-VARA, J. A.; MILLER, M. A. Immunohistochemical evaluation of GATA-4 in canine testicular tumors. **Veterinary Pathology**, v. 46, n. 5, p. 893–896, 2009.

RIBEIRO-SILVA, A.; GARCIA, S. B.; CHAHUD, F.; ZUCOLOTO, S. Impacto prognóstico da expressão imuno-histoquímica do BRCA1 nos carcinomas mamários esporádicos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, p. 197-203, 2005.

RIVERA, P.; MELIN, M.; BIAGI, T.; HÄGGSTRÖM, J.; LINDBLAD-TOH, K.; VON EULER, H. Mammary tumor development in dogs is associated with BRCA1 and BRCA2. **Cancer Research**, v. 69, n. 22, p. 8770–4, 2009.

SASSI, F.; BENAZZI, C.; CASTELLANI, G.; SARLI, G.; Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. **BMC Veterinary Research**, v. 6, p. 2-9, 2010.

SCULLY, R.; LIVINGSTON, D. M. In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. **Nature**, v. 408, n. 6811, p. 429–32, 2000.

SLATTERY, M. L.; JOHN, E. M.; STERN, M. C.; HERRICK, J.; LUNDGREEN, A.; GIULIANO, A. R.; HINES, L.; BAUMGARTNER, K. B.; TORRES-MEJIA, G.; WOLFF, R. K. Associations with growth factor genes (FGF1, FGF2, PDGFB, FGFR2, NRG2, EGF, ERBB2) with breast cancer risk and survival: the Breast Cancer Health Disparities Study. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 140, n. 3, p. 587–601, 2013.

SUN, S.; JIANG, Y.; ZHANG, G.; SONG, H.; ZHANG, X.; ZHANG, Y.; LIANG, X.; SUN, Q.; PANG, D. Increased expression of fibroblastic growth factor receptor 2 is correlated with poor prognosis in patients with breast cancer. **Journal of Surgical Oncology**, v. 105, n. 8, p. 773–779, 2012.

SUZUKI, T.; MIKI, Y.; MORIYA, T.; OHUCHI, N.; SASANO, H. Estrogen-Related Receptor alpha in Human Breast Carcinoma as a Potent Prognostic Factor, **Cancer Research**, v. 64, p. 4670–4676, 2004.

SZABO, C. I.; WAGNER, L. A.; FRANCISCO, L. V.; ROACH, J. C.; ARGONZA, R.; KING, M. C.; OSTRANDER, E. A. Human, canine and murine BRCA1 genes: sequence comparison among species. **Human Molecular Genetics**, v. 5, n. 9, p. 1289–1298, 1996.

TENHAGEN, M.; VAN DIEST, P. J.; IVANOVA, I. A.; VAN DER WALL, E.; VAN DER GROEP, P. Fibroblast growth factor receptors in breast cancer: expression, downstream effects, and possible drug targets. **Endocrine-Related Cancer**, v. 19, n. 4, p. R115–129, 2012.

THOMPSON, M. E.; JENSEN, R. A.; OBERMILLER, P. S.; PAGE, D. L.; HOLT, J. T. Decreased expression of BRCA1 accelerates growth and is often present during sporadic breast cancer progression. **Nature Genetics**, v. 9, p. 444–450, 1995.

TOMINAGA, N.; NAOI, Y.; SHIMAZU, K.; NAKAYAMA, T.; MARUYAMA, N.; SHIMOMURA, A.; KIM, S. J.; TAMAKI, Y.; NOGUCHI, S. Clinicopathological analysis of GATA3-positive breast cancers with special reference to response to neoadjuvant chemotherapy. **Annals of Oncology**, v. 23, n. 12, p. 3051–3057, 2012.

VENKITARAMAN, A. R. Cancer susceptibility review and the functions of BRCA1 and BRCA2. **Cell**, v. 108, p.171–182, 2002.

VODUC, D.; CHEANG, M.; NIELSEN, T. GATA-3 expression in breast cancer has a strong association with estrogen receptor but lacks independent prognostic value. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, v. 17, n. 2, p. 365–73, 2008.

WATSON, P.; LIEBERMAN, R.; SNYDER, C.; CLARK, V. J.; LYNCH, H. T.; HOLT, J. T. Detecting BRCA2 protein truncation in tissue biopsies to identify breast cancers that arise in BRCA2 gene mutation carriers. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 24, p. 3894–900, 2009.

WILSON, B. J.; GIGUÈRE, V. Meta-analysis of human cancer microarrays reveals GATA3 is integral to the estrogen receptor alpha pathway. **Molecular Cancer**, v. 7, p. 49, 2008.

YOON, N. K.; SELIGSON, D. B.; CHIA, D.; ELSHIMALI, Y.; SULUR, G.; LI, A.; HORVATH, S.; MARESH, E.; MAH, V.; BOSE, S.; BONAVIDA, B.; GOODGLICK, L. Higher expression levels of 14-3-3 in ductal carcinoma in situ of the breast predict poorer outcome. **Cancer Biomarkers**, v. 5, n. 4, p. 215–224, 2009.

ZHANG, Z.; TENG, C. T. Estrogen receptor-related receptor alpha 1 interacts with coactivator and constitutively activates the estrogen response elements of the human lactoferrin gene. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 20837–20846, 2000.

Capítulo 5

Estudo do padrão de metilação global do DNA em neoplasias mamárias caninas

5 ESTUDO DO PADRÃO DE METILAÇÃO GLOBAL DO DNA EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS

5.1 INTRODUÇÃO

Quando Douglas Hanahan e Robert A. Weinberg publicaram sua excelente revisão, *The Hallmarks of Cancer* no ano 2000 e na qual foram estudados minuciosamente os mecanismos moleculares envolvidos no câncer, nenhuma menção à epigenética ou à metilação do DNA foi feita àquela época.

Na ocasião, os autores discutiram a existência de seis capacidades adquiridas (*hallmarks*) que, em última análise, seriam alterações genéticas da maquinaria celular que permitiriam a eclosão do fenótipo neoplásico. Assim, a ênfase foi dada às alterações diretamente ligadas ao genoma, como a perda de função de genes supressores de tumor, que removeria os freios das mutações em genes pró-proliferação ou as mutações nos proto-oncogenes, que ativariam genes ligados à síntese de receptores de fatores de crescimento ou a produção de produtos que ativariam vias intracelulares pró-proliferação, independentemente da sinalização externa da célula.

Em sua nova revisão, *The Hallmarks of Cancer: The next Generation*, datada de 2011, estes autores mencionam os fatores epigenéticos – a metilação do DNA e a modificação das histonas – como uma das responsáveis pela emergência da instabilidade genômica, capacidade que permitiria à célula adquirir as demais capacidades, como as mutações em genes supressores de tumor ou em genes associados ao processo de morte celular ou àquelas que envolveriam os oncogenes e genes responsáveis pela imortalidade da célula.

No entanto, menos de quinze anos após aquela primeira publicação, alguns pesquisadores defendem que as alterações epigenéticas são, também, uma das capacidades adquiridas pelas células neoplásicas e que, portanto, teriam contribuição na transformação neoplásica com o mesmo peso de importância que as demais capacidades adquiridas, como auto-suficiência nos fatores de crescimento, evasão da apoptose, insensibilidade aos inibidores de crescimento, ganhando mais importância que simples coadjuvante do processo.

O próprio estudo do genoma humano, que em parte frustrou pesquisadores ao evidenciar a pequena diferença entre o genoma do homem e de seres inferiores na escala evolutiva, teve na epigenética os caminhos para a compreensão da enorme variabilidade entre os seres.

Interessa, portanto, o estudo do epigenoma, estado epigenético geral do DNA de uma célula e suas alterações, que se constituem na modificação do DNA sem que se altere a sequência de nucleotídeos alterando, contudo, a expressão gênica e o próprio fenótipo da célula. Em outras palavras, as alterações epigenéticas não estão ligadas diretamente a mutações do DNA, mas à participação de moléculas que permitam ou não a expressão de trechos específicos do DNA e suas consequências na manutenção da vida ou na permissão da emergência do fenótipo neoplásico, nos diferentes tecidos do organismo.

Este trabalho teve o objetivo de estudar o padrão imunoistoquímico da metilação global em neoplasias mamárias caninas.

5.2 REVISÃO DE LITERATURA

O desenvolvimento do câncer não depende exclusivamente de alterações genéticas, mas também, de uma memória celular, ou alterações epigenéticas, que transmitem padrões de expressão gênica hereditários, críticos para a iniciação e a progressão neoplásica. Este mecanismo aberrante, que se manifesta tanto em alterações globais na compactação ou enrolamento da cromatina, como de alterações localizadas na região promotora de genes, influenciam na transcrição de importantes genes ligados ao câncer (TING; MCGARVEY; BAYLIN, 2006).

Estas alterações, que incluem a metilação do DNA e modificação das histonas têm sido apontadas como integralmente envolvidas no desenvolvimento e manutenção do fenótipo neoplásico (BRYAN et al., 2008).

No genoma dos mamíferos, a metilação ocorre apenas nas bases citosinas (C) que estão localizadas no sentido 5' de uma base guanina (G) formando dinucleotídeos CpG. A adição de um grupo metil às citosinas ocorre normalmente no genoma dos mamíferos e a maioria das citosinas encontram-se metiladas, exceto por regiões de 0,5 a 4kb de comprimento, ricas em CpG, denominadas ilhas de CpG

e que se encontram normalmente hipometiladas. Mais de 70% dos genes que codificam proteínas possuem dentro ou próximo da região de seu promotor, pelo menos uma ilha CpG, região onde a presença da sequência CpG ocorre numa frequência muito superior à esperada. A expressão destes genes torna-se, portanto, sensível ao estado de metilação de suas ilhas CpG que estão, normalmente, não metiladas nas células normais (SUIJKERBUIJK; DIEST; DER WALL, 2010).

Uma vez que a metilação do DNA silencia a transcrição de genes, as modificações epigenéticas ocorrem de maneira orquestrada durante o desenvolvimento embrionário, determinando que a expressão de certos conjuntos de genes seja espacialmente e temporalmente restrita a tipos celulares específicos. Desta forma, o padrão de metilação do DNA é tecido-específico e “congelado” quando o desenvolvimento embrionário se completa. Alterações não programadas nos padrões de metilação do DNA, em decorrência da perda ou ganho de função de DNA metiltransferases ou dimetilases, são responsabilizadas pela ocorrência de defeitos de desenvolvimento fetal ou de doença neoplásica, por conta da alteração na expressão de oncogenes ou genes supressores de tumor (QURESHI; BASHIR, YAQINUDDIN, 2010).

Por esta razão, a hipometilação global das citosinas e a hipermetilação das ilhas de CpG são apontadas como as principais características do epigenoma neoplásico. A hipermetilação de “ilhas de CpG”, por exemplo, pode silenciar genes supressores de tumor promovendo o ciclo celular, enquanto a hipometilação, por seu turno, pode resultar na superexpressão de fatores de crescimento ou oncogenes, alteração nos mecanismos de reparo do DNA e perda da estabilidade genômica favorecendo as mutações. Estudos apontam que, em média, 8 a 10% de regiões hipometiladas foram encontradas nos adenomas e adenocarcinomas de cólon, com forte correlação entre o padrão de metilação do DNA e o fenótipo maligno (HERNANDEZ-BLAZQUEZ et al., 2000; BRYAN et al., 2008).

O papel das alterações epigenéticas também tem importância nas neoplasias mamárias, uma vez que alterações nos mecanismos ligados ao estrógeno são apontadas como decorrentes de mecanismos epigenéticos nestas neoplasias. Muitos tumores mamários são inicialmente responsivos ao estrógeno e inibidos pelos medicamentos antiestrógenos. A hipermetilação dos promotores dos genes codificadores dos receptores de estrógeno (ESR1) e progesterona (PR) é apontada como mecanismo para o desenvolvimento de tumores estrógeno-negativos e uma

das causas de insucesso da terapia hormonal. A epigenética explicaria, também, o fato que, embora raras as mutações no gene supressor de tumor BRCA1 nos carcinomas mamários esporádicos na mulher, a perda da expressão da proteína por ele codificada está freqüentemente presente nas neoplasias mamárias não-familiares. O silenciamento deste gene por mecanismos epigenéticos como a hipermetilação pode ser a explicação para este fenômeno (RIBEIRO-SILVA et al., 2005; JOVANOVIC et al., 2010).

A hipermetilação anormal do promotor de genes supressores de tumor é outro achado frequente nas neoplasias mamárias e tem implicação na iniciação e progressão da doença, representando um processo que ocorre com maior freqüência que as mutações do DNA. Uma vez que a importância de um marcador tumoral está na sua capacidade de detecção precoce dos tumores, preferencialmente ainda em estágio pré-maligno, o estudo da metilação global poderia ser o candidato perfeito com este propósito (TABACK et al., 2006; SUIJKERBUIJK; DIEST; DER WALL, 2010).

5.3 MATERIAL E MÉTODO

5.3.1 Animais

Foram utilizados neste estudo os dados epidemiológicos obtidos de levantamento realizado no banco de dados dos prontuários de atendimento do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Metropolitana de Santos – UNIMES, compreendendo o período de 2005 a 2010, nos quais se buscou diagnóstico clínico e histopatológico de neoplasia mamária de origem epitelial e dos quais havia tecido tumoral conservado em parafina em boas condições de uso.

Desta forma, foram incluídos 109 animais da espécie canina, de sexo feminino, de diferentes idades e raças, com diagnóstico clínico de doença neoplásica mamária e que haviam sido submetidas a tratamento cirúrgico.

Dos prontuários médicos foram obtidas informações quanto ao sexo, raça, peso, idade ao diagnóstico, histórico de castração anterior à doença, estadiamento clínico, exames complementares como hemograma, perfil hepático e renal, eletrocardiograma, ecocardiograma e exame ultrassonográfico abdominal quando aplicáveis e estudo radiográfico de tórax em três posições (ventro-dorsal e latero-laterais direita e esquerda) para pesquisa de metástase e estadiamento clínico da doença. Também foram obtidas informações quanto ao tipo de tratamento instituído, diagnóstico histopatológico do tumor e gradação tumoral.

A pesquisa do tempo de livre da doença e sobrevida foi realizada por meio de contato telefônico com os proprietários dos animais.

Foi considerado óbito por doença neoplásica mamária apenas para os animais com evidências inequívocas como: morte por eutanásia após recidiva ou nova apresentação do tumor ou por doença metastática pulmonar diagnosticada ao exame radiográfico ou por doença metastática ganglionar levando a edema de membro ou claudicação. Dos animais não sacrificados, apenas aqueles que morreram em decorrência de caquexia neoplásica foram incluídos neste estudo.

5.3.2 Amostras de tecido tumoral

O material de arquivo, fixado em formalina a 10% e preservado em blocos de parafina de uso histológico, foi previamente selecionado por meio de estudo histopatológico.

Resumidamente, o material dos blocos histológicos foi cortado com em cortes de 5µm de espessura, montados em lâmina de vidro e submetidos à coloração de hematoxilina e eosina (HE) para, então, serem avaliados quanto à sua qualidade histológica e reclassificação.

Para cada animal em estudo foi obtido um único bloco histológico. Dos prontuários de atendimento não foi possível estabelecer o critério de escolha utilizado pelo cirurgião para envio da amostra tumoral, para análise anatomopatológica, assim como o tempo de fixação em formalina a que foram submetidos os blocos histológicos.

5.3.3 Exame histopatológico e gradação tumoral

Dos cortes histológicos submetidos à coloração de HE foram obtidas informações quanto ao tipo e grau histológico do tumor, o número de mitoses em 10 campos de alta magnificação (aumento de 400 vezes em microscopia óptica) e invasão tumoral vascular.

Os tumores, previamente classificados por um serviço terceirizado de patologia veterinária por ocasião do atendimento clínico dos animais, foram submetidos a reclassificação quanto ao tipo e grau histológico, seguindo os critérios propostos por Goldschmidt et al. (2011).

5.3.4 Marcação imunoistoquímica

As amostras conservadas em parafina foram cortadas com micrótomo em fragmentos de espessura 5µm e montadas em lâminas silanizadas para posteriormente serem submetidas ao estudo da imunorreatividade de por meio da técnica de imunoistoquímica.

Para detecção do antígeno objeto deste estudo, foi utilizado como anticorpo primário, anticorpo monoclonal de camundongo anti-5-metil citidina – 5MeCyt (mouse monoclonal [33D3] to –Methyl Cytidine – ChIP grade – abcam ab 10805) na diluição de 1:150. A citosina é uma nucleobase enquanto a citidina é uma molécula formada quando uma citosina se liga a um anel de ribose, tornando-se um nucleosídeo. O anticorpo 5MeCyt é capaz de reconhecer as bases modificadas de citosina em 5-metil citidina, segundo o fabricante.

Resumidamente, lâminas com cortes das preparações com de 5µm de espessura foram desparafinizadas em xilol, gradualmente hidratadas em etanol e imersas em tampão fosfato 0.01 M, pH 7.4 com Tween 20 a 0.05% (PBST) para, então, serem submetidas à recuperação antigênica com tampão citrato 10 mM pH 6.0 em forno microondas por 3 ciclos de 5 minutos à potência máxima. Após resfriadas à temperatura ambiente, as amostras foram submetidas ao bloqueio de

peroxidases endógenas com peróxido de hidrogênio a 3% em água destilada por 60 minutos a temperatura ambiente e imersas em PBST. Subsequentemente as lâminas foram incubadas com soro de bloqueio TNB[®] (tampão de bloqueio Tris-NaCl CSH Protocols[™]) em câmara úmida por 60 minutos a temperatura ambiente. Após o período de bloqueio as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário à temperatura de 4°C em câmara úmida, por uma noite. Ao término do período de incubação, as preparações foram imersas em PBST, submetidas ao complexo polímero-anticorpo secundário utilizando-se o Kit LSAB+ System-HRP (K0679 Universal DAKO LSAB[®]+ Kit, Peroxidase - DakoCytomation) utilizando-se do reagente Biotynilated Link (imunoglobulinas anti-coelho, anti-camundongo e anti-cabra) por 30 minutos e então, novamente imersas em PBST, submetido ao reagente Streptavidin-HRP (estreptavidina conjugada com peroxidase). Após a ação do anticorpo secundário por 30 minutos, as lâminas foram imersas em PBST e submetidas à revelação com uso de diaminobenzidina (K3466 Liquid DAB Large Volume Substrate Chromogen System 3'3 diaminobenzidine, DakoCytomation), contracoradas com Hematoxilina de Mayer, desidratadas por sucessivas passagens em alcoóis progressivamente mais concentrados e xilol e finalmente montadas com Permount[®] e lamínula. Como controle positivo foram usados cortes histológicos que apresentaram marcação positiva durante a padronização dos diversos anticorpos em estudo e como controle negativo foram utilizados fragmentos histológicos positivos para os quais foi omitido o anticorpo primário

5.3.5 Aquisição de imagem e contagem da marcação imunoistoquímica

Ao fim do estudo imunoistoquímico os cortes histológicos foram avaliados em microscópio NIKON[®] em campos de 100, 200 e 400 aumentos. Na dependência da qualidade do corte histológico, cinco a 10 campos de aumento 400x de cada lâmina foram aleatoriamente selecionados e suas imagens registradas por meio de software de aquisição de imagem Image-Pro *Plus* versão 4.5.0.29[®] (Media Cybernetics[™], Inc.). As imagens assim obtidas foram submetidas à contagem manual de células não marcadas, marcadas fracamente, com marcação intermediária e marcação forte, totalizando-se a contagem mínima de 500 células por lâmina.

5.3.6 Obtenção dos escores e índices de marcação tumoral

As células tumorais foram consideradas positivas para imunorreatividade de 5MeCyt quando apresentaram marcação nuclear em tom de marrom ou dourado, de intensidade fraca a forte.

O escore de marcação tumoral foi obtido por meio do método Histoscore no qual se multiplica a porcentagem de células com marcação fraca por um, porcentagem de células com marcação moderada por 2 e porcentagem de células com marcação forte por 3 para se obter o escore entre 0 (zero) e 300, conforme relatado por Yoon et al. (2010).

Uma vez que não há padronização para a marcação de 5MeCyt em tumores mamários caninos e tendo em vista a escassa literatura médica a este respeito, a categorização dos tumores se fez baseado no índice obtido do quociente do escore tumoral em relação à média geométrica dos escores das lesões epiteliais não neoplásica (média geométrica igual a 129,35).

Para definir os limites de cada categoria, considerou-se hipometilado o tumor cujo índice se enquadrava no limite inferior do 25º percentil (neste caso, inferior a 0,73), hipermetilado o tumor que se situou acima 75º percentil (neste caso, acima de 1,1) e com padrão de metilação normal, os tumores cujos índices se mantiveram entre estas duas faixas. Esta categorização também foi utilizada como critério para os estudos de sobrevida.

5.3.7 Avaliação da sobrevida

As informações de sobrevida das pacientes foram obtidas por meio de contato telefônico com os proprietários dos animais.

Para fins estatísticos foi considerado o início do período de segmento a data da mastectomia e evento final a morte inequivocamente associada à doença neoplásica maligna, tal como morte por caquexia neoplásica ou eutanásia decorrente a metástase pulmonar ou outra complicação decorrente da doença.

5.3.8 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos aos testes de normalidade, aos testes paramétricos de análise de variância ANOVA e teste *t* de Student e não paramétricos, utilizando-se dos testes de Mann-Whitney para duas amostras e Kruskal-Wallis para múltiplas comparações.

Para o estudo dos escores na forma dicotomizada (hipermetilação/hipometilação), foram usados os testes do Qui-quadrado e Exato de Fisher quando aplicável.

O estudo de sobrevida foi realizado com os escores de 5MeCyt convertidos e variável categórica e submetidos a análise estatística univariada utilizando-se o modelo de riscos de COX e método de Kaplan-Meier e log-rank de Mantel-Cox para comparação entre os grupos e obtenção das curvas de sobrevida.

A análise de sobrevida multivariada foi realizada utilizando-se do modelo de riscos proporcionais de Cox.

Foi considerado como grupo controle na avaliação da imunorreatividade de 5MeCyt em função do tipo e grau histopatológico do tumor as amostras de tecido mamário com lesão epitelial não neoplásica (LENN) e os tumores benignos.

Devido ao grande número de diferentes tipos histológicos, para fins estatísticos os tumores foram agrupados por semelhança de comportamento clínico, conforme quadro 38.

Quadro 38 - Composição dos grupos segundo tipo histológico tumoral para fins de análise estatística – São Paulo – 2014

Diagnóstico histopatológico	Grupo
LENN	Ctrl
Tumores benignos	Ctrl
Carcinoma e mioepitelioma maligno	I
Carcinoma em adenoma complexo	I
Carcinoma em adenoma simples tubular	I
Carcinoma em adenoma simples túbulo-papilífero	I
Carcinoma em displasia fibroadenomatosa	I
Carcinoma em tumor misto benigno	I
Carcinoma in situ	I
Carcinoma complexo	II
Carcinoma misto	III
Carcinoma cribriforme	IV
Carcinoma ductular	IV
Carcinoma simples tubular	IV
Carcinoma simples túbulo-papilífero	IV
Carcinoma cístico-papilífero	V
Carcinoma intraductal papilífero	V
Carcinoma micropapilífero invasivo	V
Carcinoma anaplásico	VI
Carcinoma inflamatório	VI
Carcinoma sólido	VI
Carcinossarcoma	VI
Comedocarcinoma	VI

Apenas para fins estatísticos os tumores com diagnóstico carcinossarcoma foram considerados de grau histológico III. À semelhança, os carcinomas *in situ* e carcinoma em displasia fibroadenomatosa, que normalmente não são graduados, receberam grau histológico I.

Considerou-se diferença estatisticamente significativa $P < 0,05$ e intervalo de confiança de 95% (IC 95%).

Para os cálculos estatísticos foram utilizados os programas Prism 5 for Windows® v. 5.0 (GraphPad Prism®) – ANOVA; Mann-Whitney, Kaplan-Meier e

construção dos gráficos e MedCalc v. 12.7.7 for Windows® (MedCalc software bvba) o modelo de riscos proporcionais de Cox.

5.4 RESULTADOS

O material de arquivo utilizado neste estudo foi obtido de 109 animais da espécie canina, de sexo feminino, com idade média ao diagnóstico de $9,1 \pm 2,9$ anos, de diversas raças, com maior prevalência para os animais sem raça definida. A tabela 20 apresenta os animais deste experimento distribuídos por raça.

Tabela 20 - Distribuição dos animais do experimento por raça – São Paulo – 2014

Raça	N (%)
srd	39 (35,8%)
poodle	27 (24,8%)
cocker spaniel	12 (11,0%)
teckel	6 (5,5%)
labrador	5 (4,6%)
pastor Americano	5 (4,6%)
boxer	4 (3,7%)
pinsher	4 (3,7%)
rotweiler	2 (1,8%)
dobermann	1 (0,9%)
tenerif	1 (0,9%)
terrier Brasileiro	1 (0,9%)
weimaraner	1 (0,9%)
yorkshire	1 (0,9%)
Total	109(100%)

n = frequência de ocorrência do evento
(x%) proporção do evento da população
srd – animais sem raça definida

Destes animais, dezessete haviam sido castrados previamente ao diagnóstico, quatro apresentaram diagnóstico histopatológico de invasão neoplásica em linfonodo inguinal ou axilar e em nenhum deles foi diagnosticada radiograficamente metástase pulmonar quando da realização de exames complementares.

Segundo dados obtidos dos prontuários médicos, sessenta e sete animais apresentavam nódulos mamários em ambas as cadeias e, quando da apresentação em cadeia única, a maior prevalência ocorreu na cadeia mamária esquerda (26 animais) e em sua maioria na mama inguinal (15 animais). Submetidos em sua totalidade à mastectomia, 81 animais foram submetidos à mastectomia parcial e as 28 pacientes à mastectomia total. Deste último grupo, um animal apresentou recidiva enquanto dez animais apresentaram nova manifestação da doença nas glândulas mamárias remanescentes, no grupo de animais submetidos à mastectomia parcial.

Em relação ao aspecto clínico dos tumores, o diâmetro médio obtido foi de 4,6 $\pm$ 2,9 cm (menor tumor medido com 1,0 cm de diâmetro e o maior tumor medido com 15cm de diâmetro), 6 animais apresentaram tumores aderidos aos tecidos profundos, e 13 deles com tumores ulcerados.

Ao término do experimento, 14 animais ainda estavam vivos e 56 haviam morrido. Não foi possível obter informação de 39 animais cujos proprietários deixaram de comparecer o acompanhamento e não foi possível contato telefônico. Nestes casos, o tempo de segmento foi considerado do momento da mastectomia até a data último registro em seus prontuários. Entre as mortes, 19 foram atribuídas ao câncer de mama e as demais (37 animais) a outras causas como envelhecimento natural, insuficiência cardíaca, insuficiência renal ou eutanásia por outros tipos de tumores.

Após a leitura e reclassificação das lâminas dos cortes histológicos, dos cento e nove animais deste estudo, 42 corresponderam a lesão epitelial não maligna, dentre elas, 7 lesões epiteliais não-neoplásicas – LENN – (1 ectasia ductal, 1 hiperplasia tubular com fibrose e 3 hiperplasias tubulares), 35 tumores benignos, respondendo por 12,9% dos tumores benignos desta população e 67 tumores correspondentes a lesões malignas, equivalendo a 61,5% dos tumores malignos da população em estudo. Destes tumores, 46,3% (31 amostras) foram classificadas como de grau I, 31,3% (21 amostras) de grau II, 14,2% (10 amostras) de grau III e 7,5% (5 amostras) referentes a neoplasias malignas que não são graduadas (carcinoma *in situ* e carcinossarcoma). A tabela 21 apresenta a distribuição das lesões por tipo e grau histológico.

Tabela 21- Distribuição das lesões epiteliais neoplásicas e não neoplásicas em função do tipo e grau histológico – São Paulo – 2014

Lesão	Tipo	Quantidade e frequência	Grau		
			I	II	III
LENN	Hiperplasia lobular	5 (4,6)	..	..	..
	Ectasia ductal, cística, multifocal	1 (0,9)	..	..	..
	Hiperplasia lobular com fibrose	1 (0,9)	..	..	..
	Subtotal	7 (6,4%)	..	..	..
Benigna	Tumor misto benigno	12 (11,8)	..	..	..
	Adenoma complexo	9 (8,8)	..	..	..
	Adenoma intraductal papilífero	5 (4,9)	..	..	..
	Adenoma simples tubular	4 (3,9)	..	..	..
	Cistadenoma papilífero intraductal	2 (2,0)	..	..	..
	Adenoma ductal de mamilo	1 (1,0)	..	..	..
	Adenoma simples túbulo-papilífero	1 (1,0)	..	..	..
	Fibroadenoma	1 (1,0)	..	..	..
	Subtotal	35 (32,1%)	..	..	..
Maligna	Carcinoma complexo	13 (19,4)	8 (11,9)	5 (7,5)	0
	Carcinoma misto	11 (16,4)	7 (10,4)	4 (6,0)	0
	Carcinoma simples tubular	6 (9,0)	2 (3,0)	2 (3,0)	2 (3,0)
	Carcinoma cribriforme	4 (6,0)	0	4 (6,0)	0
	Carcinoma intraductal papilífero	4 (6,0)	2 (3,0)	2 (3,0)	0
	Carcinoma sólido	4 (6,0)	0	1 (1,5)	3 (4,5)
	Carcinossarcoma*	4 (6,0)	..	..	..
	Carcinoma em adenoma complexo	3 (4,5)	3 (4,5)	0	0
	Carcinoma anaplásico	2 (3,0)	0	1 (1,5)	1 (1,5)
	Carcinoma em tumor misto benigno	2 (3,0)	2 (3,0)	0	0
	Comedocarcinoma	2 (3,0)	0	0	2 (3,0)
	Carcinoma cístico-papilífero	1 (1,5)	0	1 (1,5)	..
	Carcinoma ductular	1 (1,5)	0	0	1 (1,5)
	Carcinoma e mioepitelioma maligno	1 (1,5)	1 (1,5)	0	0
	Carcinoma em adenoma simples tubular	1 (1,5)	1 (1,5)	0	0
	Carcinoma em adenoma simples túbulo-papilífero	1 (1,5)	1 (1,5)	0	0
	Carcinoma em displasia fibroadenomatosa**	1 (1,5)	..	..	..
	Carcinoma in situ**	1 (1,5)	..	..	..
	Carcinoma in situ em epitélio ductal**	1 (1,5)	..	..	..
	Carcinoma inflamatório***	2 (3,0)	..	..	..
	<i>Carcinoma intraductal papilífero</i>	..	1 (1,5)	0	0
	<i>Carcinoma simples tubular</i>	..	0	1 (1,5)	..
	Carcinoma micropapilífero invasivo	1 (1,5)	0	0	1 (1,5)
	Carcinoma simples túbulo-papilífero	1 (1,5)	1 (1,5)	0	..
	Subtotal	67 (61,5%)	31 (46,3%)	21 (31,3%)	10 (14,9%)
Total		109 (100%)	..	..	..

* carcinossarcomas são neoplasias naturalmente de pior prognóstico e não são graduadas

** neoplasias que comumente não são graduadas

*** carcinoma inflamatório é um diagnóstico clínico-patológico e foi destacado como categoria histopatológica para melhor compreensão

Dois animais apresentaram diagnóstico clínico e histopatológico compatível com carcinoma inflamatório, cujos tumores de origem, um carcinoma intraductal papilífero e um carcinoma simples tubular de graus I e II respectivamente, demonstraram marcada invasão cutânea vasculogênica.

Diferentemente dos demais marcadores estudados nas sessões anteriores, a imunorreatividade de 5MeCyt se caracterizou por marcação nuclear uniforme em alguns tumores enquanto outros apresentaram padrão de marcação nuclear pontilhado com áreas de vacuolização na superfície nuclear. Este tipo de padrão pontilhado foi considerado, neste trabalho, como marcação fraca na determinação do escore de imunorreatividade.

Os escores de imunorreatividade de 5MeCyt, na forma de variável contínua, foram submetidos a teste de normalidade e não havendo distribuição normal (Gaussiana), as análises estatísticas foram conduzidas com os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis para amostras não paramétricas.

As figuras 13A e 13B exemplificam a marcação imunoistoquímica de 5MeCyt em tecido mamário neoplásico demonstrando as diferenças características do padrão de marcação fraco, com os núcleos celulares vacuolados e marcação em padrão sólido, caracterizando marcação forte.

Figura 13A - Imagens fotográficas de padrões de imunorreatividade de 5MeCyt de lâminas de corte histológico de tecido neoplásico ou mamário, obtidas com câmara digital acoplada à ocular de microscópio de luz. Magnitude equivalente a 400x. – São Paulo – 2014

Figura 13A – Fotomicrografia de corte histológico de neoplasia mamária com estudo imunoistoquímico para 5MeCyt obtida com microscópio óptico em campo de alta magnitude (400x). Marcação nuclear fraca com característica vacuolização nuclear em um carcinoma misto de grau I com > 20 mitoses por campo 400x

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental da FMVZ/USP

Figura 13B - Imagens fotográficas de padrões de imunorreatividade de 5MeCyt de lâminas de corte histológico de tecido neoplásico ou mamário, obtidas com câmara digital acoplada à ocular de microscópio de luz. Magnitude equivalente a 400x. – São Paulo – 2014

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental da FMVZ/USP

Fotomicrografias quando digitalizadas e manejadas por editores de texto perdem sua relação com a magnitude que originariamente a gerou. Por esta razão, não foi incluída barra de escala nas imagens

As figuras 14A, 14B e 14C apresentam outras exemplos de marcação de 5MeCyt, mostrando que a marcação fraca e forte podem tanto se apresentar em neoplasias malignas quanto benignas.

O gráfico 52 apresenta a distribuição dos escores agrupados por tipo histológico da lesão mamária em valores crescentes por grupo.

Gráfico 52 – Representação gráfica dos escores de imunorreatividade de 5MeCyt em forma de histograma, com as amostra agrupadas segundo o tipo histológico da lesão. Os escores foram obtidos da soma de 3 x número de células com marcação nuclear forte com 2 x o número de células com marcação moderada e 1 x o número de células com marcação fraca; LENN – lesão epitelial não neoplásica; n = 109 amostras – São Paulo – 2014

Imunorreatividade de 5MeCyt em função do tipo histológico

Figura 14 - Imagens fotográficas de padrões de imunorreatividade de 5MeCyt de lâminas de corte histológico de tecido neoplásico ou mamário, obtidas com câmara digital acoplada à ocular de microscópio de luz. Magnitude equivalente a 400x. – São Paulo – 2014

Figura 14A – Fotomicrografia de corte histológico de neoplasia mamária com estudo imunoistoquímico para 5MeCyt obtida com microscópio óptico em campo de alta magnitude (400x). Marcação nuclear fraca com característica vacuolização nuclear em um adenoma complexo

Figura 14B – Fotomicrografia de corte histológico de neoplasia mamária com estudo imunoistoquímico para 5MeCyt obtida com microscópio óptico em campo de alta magnitude (400x). Marcação nuclear moderada em um carcinoma cístico de grau II

Figura 14C – Fotomicrografia de corte histológico de tecido mamário com estudo imunoistoquímico para 5MeCyt obtida com microscópio óptico em campo de alta magnitude (400x). Marcação nuclear intensa (núcleos com marcação marrom escuro em um carcinoma cribriforme

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental da FMVZ/USP

Fotomicrografias quando digitalizadas e manejadas por editores de texto perdem sua relação com a magnitude que originariamente a gerou. Por esta razão, não foi incluída barra de escala nas imagens

O gráfico 53 apresenta os escores de 5MeCyt em função da análise estatística com teste de Kruskal-Wallis. Os maiores escores obtidos foram de 133,1 para LENN, 120,5 para tumores benignos e 108,3 para os tumores malignos. Os menores escores obtidos foram de 82,98 para LENN, 4,89 para tumores benignos e 0,0 para tumores malignos. As médias dos escores situaram-se em $133,1 \pm 33,45$; $120,5 \pm 48,19$ e $108,3 \pm 45,04$ respectivamente para LENN, tumores benignos e tumores malignos.

Gráfico 53 – Representação gráfica dos escores de imunorreatividade de 5MeCyt agrupados segundo o tipo histológico da lesão. Medianas iguais a 136,2 para LENN; 123,5 para tumores benignos e 115,0 para tumores malignos. Teste de Kruskal-Wallis $P > 0,05$ IC 95%. Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; LENN – lesão epitelial não neoplásica; $n = 109$ animais – São Paulo - 2014

Imunorreatividade de 5MeCyt em função do tipo histológico da lesão

Quando distribuídos em função do tipo histológico, os escores de imunorreatividade de 5MeCyt não apresentaram diferença estatística entre os grupos e em função da média do grupo controle, composto pelas lesões epiteliais não neoplásicas, de $133,1 \pm 33,45$ e cuja mediana situou-se em 136,2 e $P = 0,7594$ no teste de Kruskal-Wallis para IC 95%.

O quadro 39 e o gráfico 54 sumarizam e apresentam os dados obtidos desta análise.

Quadro 39 - Distribuição das lesões epiteliais neoplásicas e não neoplásicas em função do tipo histológico da lesão tecidual – São Paulo – 2014

5MeCyt	Grupos							
	LENN	Bng	I	II	III	IV	V	VI
Número de amostras	7	35	11	13	11	12	6	14
Escore mínimo	82,98	4,895	0,8772	4,895	72,52	9,794	9,211	0,0000
25% Percentil	111,8	85,89	88,49	69,97	94,92	34,29	87,78	103,3
Mediana	136,2	123,5	109,4	133,2	119,1	104,2	114,6	113,9
75% Percentil	155,4	157,7	125,0	149,6	130,7	165,3	135,9	130,9
Escore máximo	187,2	214,6	167,7	153,8	138,3	176,9	139,6	184,0
Média por grupo	133,1	120,5	103,6	110,8	111,0	103,1	104,4	113,7
Desvio padrão	33,45	48,19	41,55	51,31	22,43	62,16	47,99	43,65
Erro padrão	12,64	8,145	12,53	14,23	6,762	17,94	19,59	11,67
95% IC inferior	102,1	104,0	75,65	79,80	95,93	63,62	54,08	88,45
95% IC superior	164,0	137,1	131,5	141,8	126,1	142,6	154,8	138,9

LENN – lesão epitelial não neoplásica

Bng – tumores benignos

I a VI – agrupamento dos tumores malignos segundo quadro 1 da sessão 3.1.10

Gráfico 54 – Representação gráfica dos escores de imunorreatividade de 5MeCyt por amostra e agrupados segundo o tipo histológico da lesão tecidual. Teste de Kruskal-Wallis $P > 0,05$ para IC 95%. Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; n = 109 animais - São Paulo – 2014

Imunorreatividade de 5MeCyt vs tipo histológico do tumor

Comportamento semelhante foi observado em função da distribuição dos escores em função do grau histológico do tumor, cujas medianas se situaram muito

próximas umas das outras e em função do grupo controle, composto pelas LENN, não havendo diferença estatística significativa entre as medianas, no teste de ruskal-Wallis, com $P = 0,1296$ IC 95%. O quadro 40 e o gráfico 55 sumarizam os resultados ora citados.

Quadro 40 - Distribuição das lesões epiteliais neoplásicas e não neoplásicas em função do grau histológico da lesão tecidual – São Paulo – 2014

5MeCyt	Grupos – grau histológico			
	Ctrl	I	II	III
Número de amostras	7	32	21	14
Escore mínimo	82,98	0,8772	9,211	0,0000
25% Percentil	111,8	77,72	101,6	103,3
Mediana	136,2	114,6	129,1	110,3
75% Percentil	155,4	129,3	145,1	124,0
Escore máximo	187,2	176,6	184,0	176,9
Média por grupo	133,1	99,71	120,7	109,3
Desvio padrão	33,45	47,19	45,06	37,86
Erro padrão	12,64	8,342	9,834	10,12
95% IC inferior	102,1	82,69	100,2	87,39
95% IC superior	164,0	116,7	141,3	131,1

Ctrl – grupo controle, composto pelas LENNs – lesões epiteliais não neoplásicas
I a III – agrupamento dos tumores malignos segundo graus histológicos 1, 2 e 3

Gráfico 55 – Representação gráfica dos escores de imunorreatividade de 5MeCyt por amostra e agrupados segundo o grau histológico da lesão tecidual. de Kruskal-Wallis $P > 0,05$ para IC 95% Na representação em boxplot de Tuckey, a caixa representa os percentis de 25 a 75%, a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os limites superior e inferior do intervalo de confiança; Ctrl – grupo controle composto por LENNs – lesões epiteliais não neoplásicas; n = 74 amostras - São Paulo – 2014

Imunorreatividade de 5MeCyt vs grau histológico do tumor

Os escores dos tumores foram, então, analisados em função dos parâmetros clínicos e histopatológicos. Quando submetidos ao modelo de Kruskal-Wallis, os escores de 5MeCyt agrupados em função do estadiamento, do tamanho do maior tumor e do número de mitoses por campo de 400 aumentos à microscopia óptica, não apresentaram diferença estatisticamente significativa de suas medianas. O quadro 41 resume o resultado dos modelos estudados.

Quadro 41 - Distribuição dos escores de imunorreatividade de 5MeCyt em função do estadiamento, tamanho do tumor e número de mitoses por campo de 400x. Teste de Kruskal-Wallis onde n = número de indivíduos por subgrupo, N = número total de indivíduos da amostra analisada e P = significância estatística – São Paulo – 2014

5MeCyt	Imunorreatividade nuclear			
	mediana	n	P	N
Estadiamento			0,1950	102
I	131,3	29		
II	113,7	38		
III	114,5	32		
IV	91,72	3		
V	-, -	0		
Tamanho do maior tumor - cm			0,1501	102
≤ 3,0	131,9	30		
> 3 - ≤ 5,0	112,8	41		
> 5,0	114,0	31		
Número de mitoses/campo 400x			0.5475	67
< 20	119.1	41		
≥ 20	114.0	23		
> 50	115.0	3		

Estudos semelhantes foram conduzidos com os escores agrupados em função de histórico de castração prévia do animal por ocasião do diagnóstico, em função do tipo de apresentação do tumor, presença de linfonodo positivo, quanto ao uso de quimioterapia adjuvante ou neoadjuvante e presença de invasão vascular ao exame histopatológico do tumor. Em todas as situações estudadas não houve diferença das medianas com significância estatística no teste de Mann-Whitney para amostras não paramétricas, conforme quadro 42, que sumariza dos resultados.

Quadro 42 - Distribuição dos escores de imunorreatividade de 5MeCyt em função do estadiamento, tamanho do tumor e número de mitoses por campo de 400x. Teste de Kruskal-Wallis onde n = número de indivíduos por subgrupo, N = número total de indivíduos da amostra analisada e P = significância estatística – São Paulo – 2014

5MeCyt	Imunorreatividade nuclear			
	mediana	n	P	N
Castração prévia à mastectomia			0.2170	102
Sim	129.1	17		
Não	115.6	85		
Apresentação múltipla dos tumores			0.0988	102
Sim	106.7	64		
Não	123.8	38		
Linfonodo positivo			0,2851	102
Sim	105.5	4		
Não	120.4	98		
Quimioterapia adjuvante/neoadjuvante			0,1769	102
Sim	89.42	8		
Não	120.4	94		
Invasão vascular			0,7594	67
Sim	115.3	10		
Não	114.6	57		

No entanto, a análise estatística da distribuição dos escores em função da ocorrência de recidiva ou nova apresentação do tumor, mostrou-se com diferença estatística no teste de Mann-Whitney para amostras não paramétrica, com mediana dos escores para animais que apresentaram recidiva igual a 94,45 e para os animais que não apresentaram recidiva, 122,3 - $P = 0,0224$ para IC 95%, conforme quadro 43 e gráfico 56, que demonstram as alterações observadas.

Quadro 43 - Distribuição dos escores de imunorreatividade de 5MeCyt em função de recidiva tumoral. Teste de Mann-Whitney com $P = 0,0224$ para IC 95% – São Paulo – 2014

5MeCyt	Recidiva	
	Sim	Não
Número de amostras	10	92
Escore mínimo	4,895	0,000
25% Percentil	45,45	96,25
Mediana	94,45	122,3
75% Percentil	117,1	144,6
Escore máximo	132,5	214,6
Média por grupo	82,06	115,8
Desvio padrão	45,24	45,41
Erro padrão	14,31	4,734
95% IC inferior	49,70	106,4
95% IC superior	114,4	125,2

Gráfico 56 – Representação gráfica dos escores de imunorreatividade de 5MeCyt em função da ocorrência ou não de recidiva tumoral. Teste de Mann-Whitney $P < 0,05$ para IC 95%. Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; $n = 102$ animais. - São Paulo – 2014

Imunorreatividade de 5MeCyt vs recidiva do tumor

Com base nos critérios de conversão dos escores em variável categórica descritos na sessão 3.3.7, os dados foram submetidos ao teste do Qui-quadrado e Exato de Fisher quando aplicável. Também nestes modelos não houve diferença

estatística significativa quando as categorias *hipermetilado*, *hipometilado* ou *padrão normal de metilação* foram agrupadas por tipo e grau histológico, por características clínicas como tamanho do tumor, estadiamento clínico e castração prévia. Também para características histopatológicas como grau e tipo histológico do tumor, número de mitoses por campo e invasão vascular não apresentaram significância estatística nos testes de contingência.

Contudo, a categorização dos escores dos tumores apresentou diferença significativa quando os escores foram agrupados em tipo de lesão histológica, ou seja, lesão maligna e lesão benigna, conforme pode ser observado na tabela 22 e gráfico 57, que apresentam o padrão de metilação em função da malignidade do tumor, com $\chi^2 = 9,387$ GL2 e $P = 0,0092$.

Tabela 22 - Frequência dos escores segundo grau de malignidade e padrão de metilação em função do índice obtido pelo tumor para o teste do Qui-quadrado – São Paulo – 2014

Tipo tumoral	Padrão de metilação			Total
	Hipometilado	Normal	Hipermetilado	
Benigno	9 (25,7%)	12 (34,3%)	14 (40,0%)	35 (100,0%)
Maligno	16 (23,9%)	41 (61,2%)	10 (14,9%)	67 (100,0%)
Total	25 (24,5%)	53 (52,0,%)	24 (23,5%)	102

Gráfico 57 – Representação gráfica da distribuição dos animais em função do padrão de metilação obtido dos escores de imunorreatividade de 5MeCyt e em função malignidade do tumor. Teste de Qui-quadrado: $\chi^2 = 9,387$ $P < 0,01$ para IC 95% Na representação em boxplot, a caixa representa o primeiro e o terceiro quartis a linha horizontal cheia representa a mediana do grupo, as barras horizontais os valores máximo e mínimo; n = 102 animais. - São Paulo – 2014

Padrão de metilação em função da malignidade do tumor

Finalmente, o padrão de metilação obtido da conversão dos escores nas categorias hipometilado, hipermetilado e padrão normal de metilação foi utilizado nos estudos de sobrevida, não se obtendo, contudo, diferença significativa entre os grupos no teste de log-rank e curva de Kaplan-Meier, com média de sobrevida de 92, o meses para os animais com tumores hipermetilados, $66,9 \pm 7,5$ meses para os animais com tumores hipometilados e $85,4 \pm 5,2$ meses para animais com padrão normal de metilação, com $X^2 = 5,182$ e $P = 0,0749$. Os mesmos resultados foram obtidos quando os dados foram submetidos à análise univariada com modelo de riscos proporcionais de Cox, conforme sumarizam o quadro 44 e o gráfico 58.

No entanto, o teste do Qui-quadrado para tendência obteve diferença estatisticamente significativa, com $P = 0,0275$ e $X^2 = 4,856$ para GL 1.

Quadro 44 - Análise de riscos proporcionais de Cox (método “enter”) para o padrão de metilação obtido por meio da imunorreatividade de 5MeCyt em análise univariada, n = 56 animais – São Paulo – 2014

Covariável	b	EP	P	Exp(b)	95% IC de Exp(b)
Hipermetilado	-12,4625	284,7878	0,9651	0,0000	0,0000 to 58,5E+234
Hipometilado	0,5335	0,5728	0,3517	1,7049	0,5580 to 5,2092

b = coeficiente de regressão beta

EP – erro padrão

Exp(b) = exponencial de beta

Gráfico 58 - Curva de Kaplan-Meier de probabilidade de sobrevida em função do padrão de metilação dos tumores obtidos por meio categorização dos escores de imunorreatividade de 5MeCyt, considerando-se a data da mastectomia evento inicial e a morte por neoplasia mamária maligna evento final. Teste log-rank de Mantel-Cox: $X^2 = 5,182$; $P > 0,05$ GL 1; teste Logrank para tendência $X^2 = 4,856$ $P < 0,05$ GL 1. n = 61 animais. - São Paulo – 2014

Sobrevida em função do padrão de metilação por 5MeCyt

5.5 DISCUSSÃO

O estudo dos mecanismos de metilação do DNA que ocorrem no câncer vem ganhando espaço na literatura científica contemporânea, na medida em que o conhecimento das alterações epigenéticas e do epigenoma têm permitido melhor compreender as alterações moleculares que determinam o desencadeamento e desenvolvimento da doença e que vão além das alterações genéticas do DNA, como as mutações.

Este trabalho buscou demonstrar que o fenômeno epigenético está presente nas neoplasias mamárias caninas e tentar relacionar a expressão de um marcador de metilação ao tipo e grau histológico, assim como, sua influência na evolução clínica da doença, como a recidiva do tumor e sobrevida.

São poucos os trabalhos que relatam o uso da técnica de imunoistoquímica para o estudo de metilação global do DNA em neoplasias, especialmente quando o foco de atenção recai sobre as neoplasias mamárias.

Em um dos trabalhos que relata a utilização da técnica de imunoistoquímica na avaliação da metilação global do DNA em tecido embrionário de camundongos e tecido tumoral de próstata, mama e cólon, os autores utilizaram técnica diferente a utilizada neste trabalho, ao desenvolverem técnica de conversão das ilhas de CpG metiladas em 5-hidroximetilcitosina (5hC), à semelhança dos estudos de Coppieters et al. (2013)(No prelo)⁴ que estudaram a metilação global do DNA na doença de Alzheimer, por meio de tratamento enzimático do material e utilização de anticorpo anti-5hC. Neste estudo, os autores relatam que foram encontrados níveis de marcação de 5hC bastante elevados nos tecidos adultos e embrionários e em estreita relação com o grau de diferenciação celular e organização tecidual, enquanto níveis muito baixos de marcação foram encontrados nos carcinomas de próstata, mama e cólon, diferindo deste trabalho, em que os níveis de marcação

⁴ COPPIETERS, N.; DIERIKS, B. V.; LILL, C.; FAULL, R. L. M.; CURTIS, M. A.; DRAGUNOW, M. Global changes in DNA methylation and hidroxymethylation in Alzheimer's disease human brain. **Neurobiology of Aging**, p. 1-11, 2013. Disponível em <http://ac.els-cdn.com/S0197458013006155/1-s2.0-S0197458013006155-main.pdf?_tid=aa9a9e00-8976-11e3-8458-00000aab0f26&acdnat=1391063031_4d1bb48960365518e3861b40c9101cfa> Acesso em: 12 jan. 2014. (No prelo)

imunoistoquímica encontraram-se distribuídos em ampla faixa de valores, mesmo nas neoplasias malignas, (HAFFNER et al., 2011).

Hernandez-Blazquez et al. (2000) desenvolveram interessante trabalho no qual o perfil de metilação global do DNA foi avaliado em amostras pareadas de tecido de cólon normal e neoplásico, utilizando-se de anticorpo anti-5MeCyt. À semelhança dos resultados obtidos neste relato, os autores descrevem que diferenças qualitativas e quantitativas foram encontradas entre as regiões normais e neoplásicas das amostras pareadas de cólon, com núcleos normais apresentando marcação escura e uniforme enquanto núcleos pleomórficos apresentaram marcação em pontos escuros delimitados por áreas de marcação fraca ou clara. Para estes autores, os pequenos pontos poderiam ser áreas hipermetiladas da cromatina, enquanto as áreas claras provavelmente seriam áreas sugestivas de hipometilação, a exemplo do que se observa em células leucêmicas, justificando a marcação em padrão pontilhado encontrada em algumas amostras tumorais do presente trabalho.

Neste estudo foi observada diferença estatística significativa no padrão de metilação dos tecidos não neoplásicos, tumores benignos e tumores malignos, quando os escores de imunorreatividade foram convertidos em variável categórica (*hipo; padrão normal e hipermetilado*). Estes resultados conflitam com trabalho que buscou correlacionar o padrão de metilação total por meio de estudo imunoistoquímico utilizando anticorpo anti-5MeCyt em lesões pré-neoplásicas e neoplásicas de cólon de útero, conservadas em parafina, que não encontrou diferença significativa no padrão de metilação global do DNA entre tecidos de cólon normais, benignos e malignos (MISSAOU et al., 2010). No entanto, trabalho que estudou o padrão de metilação global do DNA por meio de estudo imunoistoquímico em tecido neoplásico prostático, tecido benigno adjacente ao tecido prostático neoplásico e neoplasia prostática intraepitelial de alto e baixo grau, observou que uma grande quantidade de pacientes portadores de neoplasia prostática apresentava padrão hipometilado em suas neoplasias, à semelhança dos achados do presente relato (BO YANG et al., 2013).

Contudo, em função de variáveis clínicas como estadiamento, grau histológico e sobrevida, este trabalho encontra respaldo nos relatos de Missaoui et al. (2010) e Bo Yang et al. (2013) no qual ambos os relatos afirmam que não houve relação

entre grau histológico do tumor e fatores prognósticos clínicos e o padrão de metilação total.

A observação de maior proporção de tumores hipometilados no grupo de neoplasias malignas também está de acordo as observações de Hernandez-Blazquez et al. (2000) que relataram um maior número de tumores hipometilados dentre os tumores malignos, quando comparados com os tumores benignos ou com as regiões benignas vizinhas das áreas de malignidade.

Finalmente, a observação neste trabalho da relação da imunorreatividade de 5MeCyt com recidiva tumoral remete ao trabalho de Mahapatra et al. (2012) que, embora utilizando de outra tecnologia para estudo da metilação global do DNA, por meio da conversão das áreas metiladas com bissulfito e utilização de técnica de micro-arranjo, observou que a metilação global estava associada à recidiva dos tumores de próstata em seres humanos, à semelhança de Suijkerbuijk, Diest e Der Wall (2010) que descrevem esta mesma observação em neoplasias mamárias, em revisão que estudou o assunto. Levando-se em conta que a hipometilação é implicada como uma das responsáveis pela ativação de genes codificadores de fatores de crescimento e à transformação maligna, é correto inferir que animais que apresentem alterações em seu epigenoma favorecendo a hipometilação, estejam sujeitos à recidiva tumoral (BRYAN et al., 2008).

5.6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível caracterizar o comportamento da metilação global por meio de imunoistoquímica nas neoplasias mamárias caninas mostrando que o fenômeno está presente neste tipo de neoplasia, nesta espécie.

Mostrou-se, também, que a metilação, embora possua a capacidade de modificar a expressão gênica, não é fator condicionante ao fenótipo neoplásico, uma vez que neoplasias mamárias benignas e malignas mostraram padrões semelhantes de metilação, com tumores benignos apresentando, a exemplo dos tumores malignos, tanto padrão hiper como hipometilado entre uma população francamente de padrão considerado, neste trabalho, como normal.

A técnica mostrou-se eficaz, também, na comparação do padrão de metilação entre neoplasias malignas e benignas, embora não se associando ao tipo histológico tumoral ou a fatores prognósticos clínicos.

No entanto, a maior contribuição da técnica de avaliação da metilação global do DNA está na possibilidades de estudo do comportamento dos tumores recidivantes ou de nova apresentação de tumores nestes animais, uma vez que os escores obtidos pela marcação imunoistoquímica de 5MeCyt apresentaram-se mais baixos nos animais que demonstraram recidiva tumoral ou nova apresentação de tumores nas glândulas remanescentes, tornando esta técnica uma ferramenta eficaz na detecção de tumores com propensão à recidiva.

REFERÊNCIAS

BO YANG; HANG SUN; WEI LIN; HOU WUGANG; HANG LI; LIYING ZHANG; LI FANFAN; YU GU; YUE SONG; QING LI; FENG ZHANG. Evaluation of global hypomethylation in human prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasm tissues by immunohistochemistry. **Urology Oncology**: seminars and original investigations, v. 31, p. 628-634, 2013.

BRYAN, J. N.; TAYLOR, K. H.; HENRY, C. J.; SELTING, K. A.; RAHMATPANAH, F.; LEWIS, M. R.; CALDWELL, C. W. DNA methylation in cancer: techniques and preliminary evidence of hypermethylation in canine lymphoma. **Cancer Therapy**, v. 6, p. 137-148, 2008.

GOLDSCHMIDT, M.; PEÑA, R.; RASOTTO, R.; ZAPULLI, V. Classification and Grading of Canine Mammary Gland Tumors. **Veterinary Pathology**, v. 48, p. 117, 2011. Disponível em: <<http://vet.sagepub.com/content/48/1/117>> Acesso em: nov. 2013.

HAFFNER, M. C.; CHAUX, A.; MEEKER, A. K.; ESOPI, D. M.; GERBER, J.; PELLAKURU, L. M.; TOUBAJI, A.; ARGANI, P.; IACOBUZIO-DONAHUE, C.; NELSON, W. G.; NETTO, G. J.; DE MARZO, A. M.; YEGNASUBRAMANIAN, S. Global 5-hydroxymethylcytosine content significantly reduced in tissue stem/progenitor cell compartments and in human cancers. **Oncotarget**, v. 2, p. 627-637, 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A.; FRANCISCO, S. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, 2011.

HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; HABIB, M.; DUMOLLARD, J. M.; BARTHELEMY, C.; BENCHAI, M.; CAPOA, A.; NIVELEAU, A. Evaluation of global DNA hypomethylation in human colon cancer tissues by immunohistochemistry and image analysis. **Gut**, v. 47, p. 689-693, 2000.

JOVANOVIC, J.; RØNNEMBERG, J. A.; TOST, J.; KRISTENSEN, V. The epigenetics of breast cancer. **Molecular Oncology**, v. 4, p. 242-254, 2010.

MAHAPATRA, S.; KLEE, E. W.; YOUNG, C. T. F.; SUN, Z.; JIMENEZ, R. E.; KLEE, G. G.; TINDALL, D. J.; DONKANA, K. V. Global methylation profile for risk prediction of prostate cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 18, p. 2882-2895, 2012.

MISSAOUI, N.; HMISSA, S.; DANTE, R.; FRAPPART, L. Global DNA methylation in precancerous and cancerous lesions in the uterine cervix. **Asian Pacific Journal of Cancer**, v. 11, p. 1741-1744.

QURESHI, S. A.; BASHIR, M. U.; YAQINUDDIN, A. Utility of DNA methylation markers for diagnosing cancer. **International Journal of Surgery**, v. 8, p. 194-198, 2010.

RIBEIRO-SILVA, A.; GARCIA, S. B.; CHAHUD, F.; ZUCOLOTO, S. Impacto prognóstico da expressão imuno-histoquímica do BRCA1 nos carcinomas mamários esporádicos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, p. 197-203, 2005.

SUIJKERBUIJK, K. P. M.; DIEST, P. J.; VAN DER WALL, E. Improving early breast cancer detection: focus on methylation. **Annals of Oncology**, v. 22, n. 1, p. 24-29, 2010.

TABACK, B.; GIULIANO, A.; LAI, R.; HANSEN, N.; SINGER, F. F. R.; PANTEL, K.; HOON, D. S. B. Epigenetic analyses of body fluids and tumor tissues. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1075, p. 211-221, 2006.

TING, A. H.; MCGARVEY, K. M.; BAYLIN, S. B. The cancer epigenome--components and functional correlates. **Genes & Development**, v. 20, n. 23, p. 3215-3231, 2006

YOON, N. K.; SELIGSON, D. B.; CHIA, D.; ELSHIMALI, Y.; SULUR, G.; LI, A.; HORVATH, S.; MARESH, E.; MAH, V.; BOSE, S.; BONAVIDA, B.; GOODGLICK, L. Higher expression levels of 14-3-3 in ductal carcinoma in situ of the breast predict poorer outcome. **Cancer Biomarkers**, v. 5, n. 4, p. 215-224, 2009.

6 CONCLUSÕES GERAIS

O comportamento dos diversos marcadores deste estudo, com respostas ora condizentes com o esperado para um tipo histológico, ora se apresentando de modo conflitante aos indicadores clínicos ou mesmo em relação a outros marcadores, reforça a noção que o câncer é uma doença multifacetada e que os caminhos seguidos pela célula normal em direção ao fenótipo neoplásico, aparentemente não obedecem a uma ordem prestabelecida.

Somente esta noção explicaria, por exemplo, que a expressão de GATA3, tido como um gene supressor de tumor, acompanhasse a expressão de FGFR2 que, neste estudo, mostrou-se um indicador de prognóstico ruim. Teria a maior expressão de GATA3 o efeito de amenizar os efeitos de FGFR2 na célula cancerosa?

Ki67 mostrou-se um potente marcador independente com valor prognóstico no câncer de mama nas fêmeas caninas e seu uso na rotina diagnóstica deveria ser amplamente estimulado.

Outra resposta conflitante foi obtida nos estudos de metilação global, ainda que este marcador tenha se mostrado eficaz na detecção de pré-malignidade. Se a metilação pode se expressar em níveis muito baixos ou muito altos tanto em tumores benignos quanto malignos, qual é então, seu verdadeiro papel na oncogênese, ao menos nas neoplasias mamárias caninas.

Novos trabalhos se justificam na tentativa de elucidar estes fenômenos e esclarecer a verdadeira interação entre a expressão de GATA 3 e FGFR2 e do papel preciso da metilação global do DNA nos tumores.

A finalidade de estudos integrados que correlacionem aspectos clínicos, morfológicos e moleculares das neoplasias é avançar em seu conhecimento e obter novas perspectivas para o sucesso no tratamento destas doenças. Esperamos que, com este trabalho, tenhamos contribuído para atingir estes objetivos.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, F. H. E.; FIGUEIROA, F. C.; BERSANO, P. R. O.; BISSACOT, D. Z.; ROCHA, N. S. Malignant mammary tumor in female dogs: environmental contaminants. **Diagnostic Pathology**, v. 5, n. 45, 2010; doi:10.1186/1746-1596-5-45. Disponível em: <[http:// www.diagnosticpathology.org/content/5/1/45](http://www.diagnosticpathology.org/content/5/1/45) > Acesso em: jan. 2014.

CHATTERJEE, S. K.; ZETTER, B. R. Cancer biomarkers: knowing the present and predicting the future. **Future Oncology**, v.1, n. 1, p. 37-50, 2005

HARRIS, L.; FRITSCH, H.; MENNEL, R.; NORTON, L.; RAVDIN, P.; TAUBE, S.; SOMERFIELD, D.; HAYNES, D. F.; BAST JR., R. C. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 33, p. 5287-5312, 2007.

PAOLONI, M. C.; KHANNA, C. Comparative oncology today. **Veterinary Clinics of North America: small animal practice**, v. 37, p. 1023-1032, 2007.

ZAGO, A.; PEREIRA, L. A.; BRAGA, A. L.; BOUSQUAT, A. Breast cancer mortality in women of Southern Brazil, 1980-1999. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, p. 641-645, 2005.