

ABORDAGEM DA PROLIFERAÇÃO CELULAR PELA TÉCNICA DE IMUNO-
HISTOQUÍMICA COM BIOMARCADOR KI-67 E CARACTERIZAÇÃO
HISTOPATOLÓGICA NO CARCINOMA MAMÁRIO FELINO

APPROACH TO CELL PROLIFERATION BY IMMUNOHISTOCHEMISTRY
TECHNIQUE WITH THE KI-67 BIOMARKER AND HISTOPATHOLOGICAL
CHARACTERIZATION IN FELINE MAMMARY CARCINOMA

Mariana Fernandes JORGE¹; Rubia Mitalli TOMACHEUSKI²; Alessandre HATAKA³; Júlio
Lopes SEQUEIRA³.

¹*Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho” (UNESP), Rubião Júnior s/n, Botucatu – São Paulo, Brasil.*

marifjorge@hotmail.com

²*Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Anestesiologia, Faculdade de Medicina da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) Rubião Júnior s/n,
Botucatu – São Paulo, Brasil.*

³*Docentes do Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Rubião
Júnior s/n, Botucatu - SP, Brasil.*

Resumo

A neoplasia mamária felina tem altos índices metastáticos e de agressividade, similar aos fatores biológicos do câncer de mama em mulheres. O exame histopatológico é fundamental para o diagnóstico e prognóstico, assim como o estadiamento clínico. Contudo, a imuno-histoquímica é mais fidedigna para mensurar a proliferação celular, sendo forte fator prognóstico e preditivo. O objetivo deste estudo é evidenciar o uso da técnica de imuno-histoquímica para avaliar a proliferação celular, através do uso do anticorpo Ki-67; e ainda descrever os tipos e graus histopatológicos do carcinoma mamário de gatas, seus critérios de malignidade - índice mitótico e invasão vascular. Foram utilizadas 31 amostras de neoplasias malignas de aparecimento espontâneo da glândula mamária de gatas submetidas à mastectomia, adquiridas dos arquivos de dois laboratórios particulares localizados em

Campinas-SP e Marília-SP. Confeccionou-se as lâminas a partir de blocos de parafina, com três µm de espessura, coradas com hematoxilina e eosina (HE). O diagnóstico histopatológico foi conduzido por dois patologistas, em momentos distintos, classificando-as quanto ao tipo e graduação, invasão vascular e índice mitótico (IM). A imuno-histoquímica foi realizada com recuperação antigênica térmica e encubação “*overnight*” na diluição de 1:100 para Ki-67. Dentre os resultados, obteve-se para tipo histopatológico: 41,9% túbulo-papilífero; 45,2% sólido; e 12,9% cribriforme. Com relação à graduação, as amostras foram classificadas em: grau I (GI) 9,7%; grau II (GII) 41,9%; e grau III (GIII) 48,4%. A invasão vascular foi observada em 35,5% das amostras, todas GII e GIII. Para índice mitótico: 12,9% das amostras foram IM1; 6,45% IM2; e 80,65% IM3. O índice proliferativo (IP) teve média geral superior à nota de corte (14%), com valor de 32% nos túbulo-papilíferos, e 38% no tipo sólido e cribriforme; e quanto à graduação foram: 23% GI, 39% GII e 36% GIII. Apenas uma das amostras demonstrou Ki-67 abaixo de 14%. A imuno-histoquímica se mostrou o método mais eficaz para predizer a proliferação celular. A graduação histopatológica demonstrou ser mais importante que a classificação de tipos, pois teve melhor representatividade do potencial infiltrativo e metastático. Porém, a discrepância dos valores de IP sugere realização de novos estudos.

Palavras-chave: Gata, câncer de mama, diagnóstico, carcinoma, prognóstico.

Abstract

The feline mammary neoplasia has high metastatic indices and aggressiveness, similar to biological factors of the women breast cancer. The histopathological examination is essential for diagnostic and prognostic, even as clinical staging. Nevertheless, immunohistochemistry is more reliable to measure the cellular proliferation, been a strong factor prognostic and predictive. This study aims to evidence the use of immunohistochemistry technique to evaluate the cellular proliferation, through the Ki-67 antibody; to describe the histopathological type and grading of breast carcinoma of female cats, and its criteria of malignancy - mitotic index and vascular invasion. It used 31 samples of malignant neoplasias of spontaneous appearance of the female cats mammary gland, submitted to mastectomy, acquired from two particular laboratories located in Campinas-SP and Marília-SP. The blades made with paraffin blocks, three µm of thickness, colored with hematoxylin and eosin (HE). The histopathological diagnostic was performed by two

pathologists, in distinct moments, classifying types, grades, vascular invasion and mitotic index (MI). The immunohistochemistry realized with thermal antigenic recuperation and overnight incubation in dilution 1:100 to Ki-67. The results obtained, to histopathological type: 41,9% tubulopapillary, 45,2% solid, and 12,9% cribriform; to grading, the samples were classified in 9,7% grade I (GI); 41,9% grade II (GII); and grade III (GIII) 48,4%. The cellular invasion observed in 35,5% of the samples, all GII and GIII. The mitotic index: 12,9% of samples were MI1; 6,45% MI2; and 80,65% MI3. The proliferation index (PI) had an overall mean superior to the cut-off score (14%), with a value of 32% in the tubulopapillary, and 38% in the solid and cribriform types; and regarding grade was 23% GI, 39% GII and 36% GIII. Only one sample demonstrated Ki-67 below of 14%. The immunohistochemistry showed being the most effective method to predict the cellular proliferation. The histopathological grading demonstrated to be more important than the classification of types because of its better representativity of infiltrative and metastatic potential. However, the discrepancy of the PI values suggests performing new studies.

Keywords: Cats, mammary cancer, diagnostic, carcinoma, prognostic.

INTRODUÇÃO

A neoplasia mamária é o tipo de terceira maior incidência na espécie felina (HAYES; MILNE; MANDELL, 1981; RUTTEMAN; WITHROW; MACEWEN, 2013), superada apenas por tumores de pele e do tecido hematopoiético (OVERLEY et al., 2005). Seu comportamento maligno se manifesta pela infiltração local e de tecidos adjacentes (AMORIM et al., 2006; ZAPPULLI et al., 2005), com a probabilidade de metástase em cerca de 80% dos casos (SORENMO KU, WORLEY DR, 2014). Os locais de eleição para implantação à distância são linfonodos regionais e pulmões, embora pleura, fígado, glândula adrenal e rins também possam ser acometidos (MORRIS et al., 2008; SOARES et al., 2016a). Este padrão também é observado em mulheres portadoras de câncer de mama, onde a metástase a distância é responsável por cerca de 90% dos óbitos (GUNASINGHE et al., 2012). Há similaridade entre a espécie felina e a humana quanto aos fatores biológicos que influenciam esta patologia (MARIA et al., 2005), como: idade de incidência, fatores de risco, prognósticos, histopatologia, padrão de metástase e resposta a terapia (HAHN; BRAVO;

AVENELL, 1994). Assim, sugere-se a espécie felina como modelo experimental para os tipos triplo-negativo e basal do tumor de mama em mulheres (TAMAMOTO et al., 2014).

Os componentes que dão origem as neoplasias mamárias são diferentes entre si, tumores benignos (como os adenomas) têm como componente celular original a hiperplasia ductal, enquanto as lesões malignas são classificadas em: carcinoma túbulo-papilífero, origem na hiperplasia lobular; sólido, derivam da hiperplasia epitelial; e os cribriforme, decorrentes da proliferação de lóbulos, os quais tendem a crescer não só em tamanho como também em volume (*adenosis*) (HUGHES; DOBSON, 2012). Neste estudo apenas os carcinomas foram considerados.

O prognóstico da paciente felina acometida pelo tumor de mama é previsto por: dados do estadiamento clínico, como o tamanho tumoral (MACEWEN et al., 1984); pela invasão linfovascular observada no exame histopatológico (MILLS et al., 2015); e na extensão da cirurgia empregada (MORRIS et al., 2008). O índice mitótico (IM) gerado pela análise morfológica com coloração de rotina é também considerado forte marcador prognóstico (WINTZER et al., 1991). O IM faz parte dos critérios utilizados para a graduação do tumor, mas tem seu valor restrito por permitir a identificação apenas da fase de mitose, período muito curto dentro do ciclo celular, subestimando a proliferação tumoral (GRIFFEY; KRAEGEL; MADEWELL, 1999; SARLI et al., 1999).

Em animais, o exame histopatológico é o método de eleição para o diagnóstico definitivo, possibilitando: tipificação morfológica, graduação da neoplasia, avaliação das margens cirúrgicas, e detecção do envolvimento de linfonodos regionais; além de permitir o posterior emprego de marcadores imuno-histoquímicos (CASTAGNARO et al., 1998; MATOS et al., 2012; MILLS et al., 2015; MISDORP, 2008; MISDORP et al., 1999), técnica que na oncologia permite identificar fatores prognósticos e preditivos (HUGHES; DOBSON, 2012; MATOS et al., 2012). Foi proposta a classificação molecular para o carcinoma mamário felino, embasado nos padrões desenvolvidos para espécie humana, através de um painel com cinco biomarcadores, já padronizados para mulheres (SOARES et al., 2016b). Em 2018 o “Consenso para o diagnóstico, prognóstico e tratamento de tumores mamários em felinos”, reforçou a importância desta classificação imunofenotípica para fins prognósticos e terapêuticos (NARDI et al., 2018).

Dentre estes biomarcadores, o de maior destaque é o anticorpo Ki-67, marcador de proliferação celular, encontrado somente na região intranuclear de células em crescimento e divisão, sua expressão é observada em todas as fases do ciclo celular (G1, S, G2 e M), com exceção da fase de repouso (G0), não marcando assim células quiescentes (CATTORETTI et

al., 1992; DIAS PEREIRA; CARVALHEIRA; GÄRTNER, 2004). Através da análise deste biomarcador se obtém o índice proliferativo (IP).

Um dos primeiros relatos sobre o Ki-67 é da década de 80, em estudo sobre seu potencial prognóstico em neoplasias de células redondas (GERDES et al., 1986). Este biomarcador representa um dos principais fatores prognósticos do câncer de mama em mulheres, sendo indicativo de tempo livre sem a doença e sobrevida (BACUS et al., 1989; GOLDHIRSCH et al., 2013). O ponto de corte aceito atualmente para gatas é de 14% igual ao estabelecido para mulheres (GOLDHIRSCH et al., 2013). A imunofenotipagem tumoral é ponto inicial contra o câncer de mama em mulheres, e mesmo já estabelecido, divergências são apontadas (TYAGI; DHESY-THIND, 2018).

O tratamento recomendado para as gatas com carcinoma mamário consiste em mastectomia bilateral radical e quimioterapia adjuvante, o que invariavelmente levam há baixa expectativa de vida. O diagnóstico precoce está intimamente ligado ao melhor prognóstico (Giménez et al., 2010). O que reforça a necessidade de pesquisas sobre novas ferramentas diagnósticas e terapêuticas.

O objetivo deste estudo é evidenciar o uso da técnica de imuno-histoquímica para avaliar a proliferação celular, através do uso do anticorpo Ki-67; e ainda descrever os tipos e graus histopatológicos do carcinoma mamário de gatas, seus critérios de malignidade - índice mitótico e invasão vascular.

MATERIAIS E MÉTODO

Foram utilizadas 31 amostras de neoplasias malignas da glândula mamária de gatas (curso espontâneo) submetidas à mastectomia, adquiridas dos arquivos de dois laboratórios particulares localizados nas cidades de Campinas-SP e Marília-SP. Os tumores benignos, assim como os carcinomas com extensas áreas de necrose não foram incluídos. A partir dos blocos de parafina foram confeccionadas lâminas, com três µm de espessura, para a coloração de hematoxilina e eosina (HE) e também para a técnica de imuno-histoquímica. Através das lâminas coradas com HE realizou-se o diagnóstico histopatológico por dois patologistas, em momentos distintos, com base na classificação da Organização Mundial da Saúde, subdivididas em três grupos: túbulo-papilífero, sólido, e cribriforme (MISDORP, 2008; MISDORP et al., 1999).

A graduação das lesões foi determinada de acordo com sistema de classificação padronizado para mulheres de Elston & Ellis (1998) (**Quadro 1 e Quadro 2**).

Quadro 1. Critérios e escores de graduação histopatológica para carcinoma mamário.

Critérios histopatológicos	Escore
Formação de túbulos	
Abrange a maior parte do tumor (>75%)	1
Moderado grau de acometimento (de 10 a 75%)	2
Pouco ou ausente (menor que 10%)	3
Pleomorfismo nuclear	
Núcleo pequeno, regular e uniforme	1
Aumento moderado de tamanho, vesiculação e variabilidade	2
Cromatina vesicular com acentuada variação de tamanho e forma	3
Contagem Mitótica	
0 – 8	1
9 – 16	2
≥ 17	3

Fonte: Elston & Ellis (1991).

Quadro 2. Graduação das neoplasias malignas de mama.

Pontuação final	Grau	Comentário
3-5	I	Bem diferenciado
6-7	II	Moderadamente diferenciado
8-9	III	Pobrememente diferenciado

Fonte: Elston & Ellis (1991).

Para a obtenção do índice mitótico realizou-se a contagem de todas as figuras de mitose observadas em 10 campos aleatórios com objetiva de 40x aumento. A partir do número total de mitoses aplicou-se o escore de acordo com sistema de Nottingham (ELSTON, C.W.; ELLIS, 1991).

Os cortes das neoplasias mamárias com três micrômetros de espessura foram posicionados em lâminas eletrostáticas (ImmunoSlide®, EasyPath®) e mantidas em estufa a 60°C por 18 horas. Reações de controle positivo foram incluídas nas baterias de processamento conforme indicação do fabricante dos anticorpos. O controle negativo foi produzido sem a adição do anticorpo primário no corte de neoplasia mamária, sendo incubado somente o diluente.

Todas as amostras foram processadas segundo o protocolo do Laboratório de Imuno-histoquímica do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ-UNESP, Campus de Botucatu. O anticorpo primário Ki-67 (clone MIB-1, Dako[®], código M7240) foi padronizado para o tecido mamário da gata junto ao tecido de controle positivo. Os cortes nas lâminas permaneceram em estufa a 60° C por 12 horas, em seguida foram desparafinizadas e hidratadas. A recuperação antigênica ocorreu na câmara de pressão microprocessada a 125° C por 30 minutos (Pascal, DakoCytomation[®]) com tampão Citrato pH 6,0. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com peróxido de hidrogênio com dois banhos, cada um de 10 minutos. O bloqueio da proteína endógena foi feito numa solução leite desnatado por uma hora. Incubado “*overnight*” (18 horas) a quatro graus Celsius. As lavagens a partir deste ponto foram realizadas com solução TRIS tamponada com pH 7,4.

Utilizado para amplificação e detecção o kit Novolink[®] (Leika biosystems, Polymer Detection System, anti-mouse - rabbit) para o marcador de proliferação. Permaneceram 30 minutos sobre as amostras, seguido por lavagem com TRIS.

Para finalizar a técnica de marcação, a aplicação do Cromógeno DAB (Novocastra[®]), do kit Novolink[®], na concentração de 50 µl do cromógeno para cada um mL de diluente (Novolink, DAB Substrate Buffer). Em seguida, mantido em Hematoxilina de Harris por quatro minutos, passado para água por 10 minutos para posterior montagem.

A avaliação da reação de imuno-histoquímica foi realizada com auxílio de microscópio acoplado a câmera digital (Carl Zeiss – AX10, imager. A1; AxioCam MRc – 60 N-C 2/3” 0,63x) o programa de análise de imagens AxioVision Rel. 4,6.

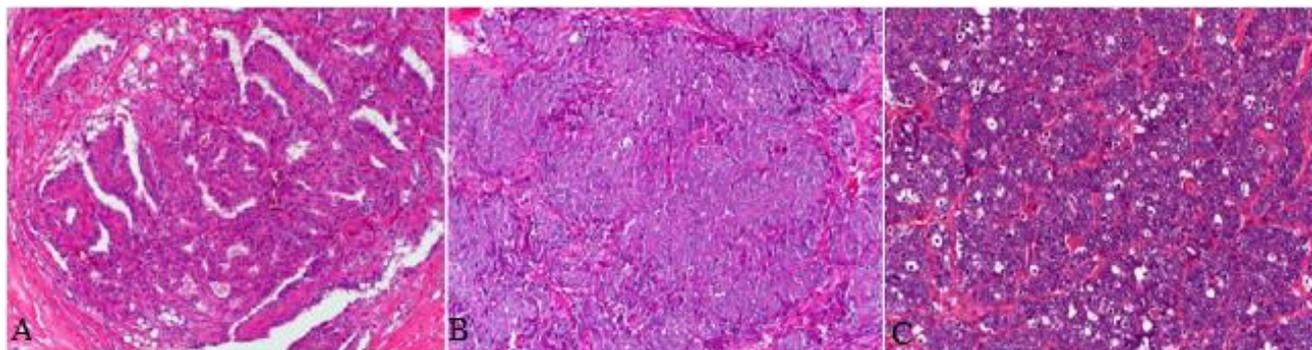
A reação imuno-histoquímica foi estimada pela marcação nuclear positiva das células neoplásicas. Utilizando a contagem de dez campos aleatórios em objetiva 40x até chegar em 100 células neoplásicas marcadas e não marcadas em cada um deles. Estes valores foram transformados em percentual de células positivas.

As análises estatísticas, e as representações gráficas, foram realizados com o software estatístico GraphPad 5[®] (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA), sendo consideradas diferenças estatisticamente significantes onde $p < 0,05$. A comparação entre as médias de Ki-67 por tipo tumoral e grau foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA), seguida por pós-teste de Tukey.

RESULTADOS

As amostras foram classificadas em: 41,9% túbulo-papilífero (n=13); 45,2% sólido (n=14); e 12,9% cribriforme (n=4). Com relação à graduação histopatológica, sem levar em conta o tipo da lesão, obteve-se para GI 9,7% das amostras; 41,9% foram classificadas em GII; e 48,4% em GIII (**Figura 1**).

Figura 1. Fotomicrografia de carcinomas mamários em gatas exemplificando tipo e grau histológico. Coloração HE, objetiva 20x. Um carcinoma do túbulo-papilífero de grau I (A); um tipo sólido de grau II (B); e por fim um cribriforme de grau III (C).



O quadro a seguir demonstra a frequência da graduação segundo os tipos histopatológicos nas amostras de carcinoma mamário de gatas (**Quadro 3**).

Quadro 3. Tipo e graduação histopatológica de carcinoma mamário em gatas.

Tipo	Grau I	Grau II	Grau III	Total
Túbulo-papilífero	n=3 – 23%	n=10 – 77%	n=0	n=13 – 41,9%
Sólido	n=0	n=2 – 14%	n=12 – 86%	n=14 – 45,2%
Cribriforme	n=0	n=1 – 25%	n=3 – 75%	n=4 – 12,9%
Total	n=3-9,7%	n=13- 41,9%	n=15- 48,4%	n=31-100%

A invasão vascular foi observada em 35,5% das amostras (n=11), destas: cinco eram túbulo-papilífero GII; uma amostra, sólido GII; quatro amostras, sólido GIII; e uma classificada como cribriforme GIII.

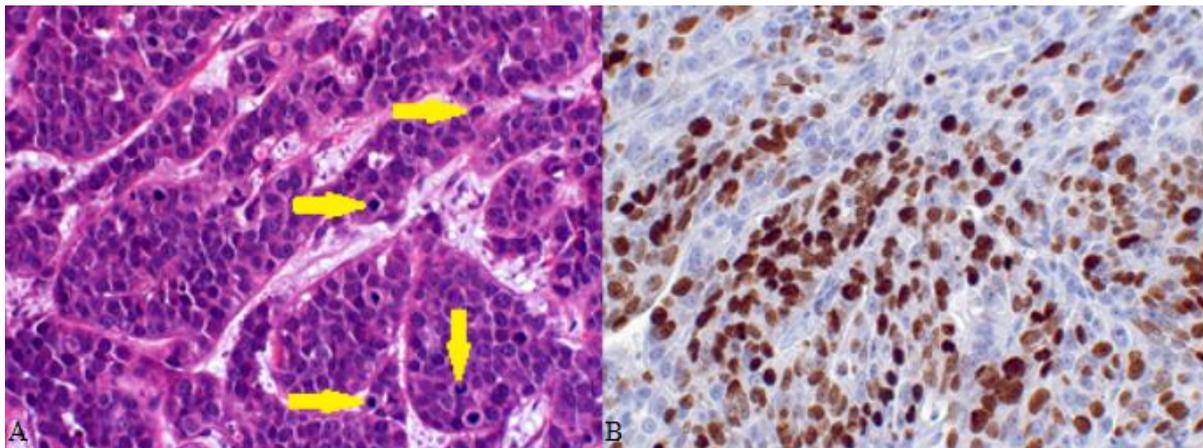
Em relação a contagem de mitoses, como valores mínimo, médio e máximo, foram encontrados os seguintes resultados respectivamente: 6, 33 e 86 figuras mitóticas em 10 campos aleatórios com objetiva de 40x (**Figura 2A**). A quantidade de amostras e seus

respectivos índices mitóticos (IM) foram: 12,9% das amostras com escore 1 (n=4); 6,45% com escore 2 (n=2); e 80,65% com escore 3 (n=25). Todas as amostras classificadas com IM 1 e IM 2, e ainda, outras sete amostras classificadas com IM 3, eram do tipo túbulo-papilífero. As amostras do tipo sólido e cribriforme apresentaram IM 3.

Considerando as contagens de figuras mitóticas, comparando os três grupos histopatológicos, houve diferença significativa entre os túbulo-papilífero e sólido ($p = 0,0108$); quanto ao grau, entre o I e II, e também entre I e III ($p = 0,0002$).

Em relação ao índice de proliferação (IP), o valor mínimo observado foi de 10%, o médio 36% e o máximo 67%. A média geral do IP foi superior a 14%, quanto aos tipos, o valor aproximado foi de 32% nos túbulo-papilífero e 38% nos sólidos e cribriformes. Quanto à graduação obteve-se 23% para GI, 39% para GII e 36% para GIII. Não houve diferença significativa em relação aos três grupos histopatológicos ($p = 0,5229$; $r = 0,04525$) e nem mesmo quanto à graduação histopatológica ($p = 0,2129$; $r = 0,1046$). Apenas uma das amostras demonstrou Ki-67 abaixo da nota de corte (14%), a qual foi classificada em cribriforme de GIII. Não houve achados para realizar esta estatística, aplicando-se então análise descritiva. Os padrões de marcação positiva para o anticorpo Ki-67 podem ser observados na **figura 2B**.

FIGURA 2 - Carcinomas sólido em gatas, objetiva 40x. (A) Acentuado número de mitoses, algumas sinalizadas por setas amarelas HE. (B) Marcação para Ki-67 de forte intensidade e alto índice.



DISCUSSÃO

Dentre as amostras estudadas, o tipo histopatológico mais comum foi o sólido, seguido pelo túbulo-papilífero, e por fim o cribriforme, condizendo com a literatura que aponta o sólido como mais frequente (39%), seguido pelo túbulo-papilífero (12%), e a minoria (8%) os mais invasivos, dentre eles o cribriforme (SEIXAS et al., 2011). Houve certa divergência com dados nacionais (SILVA et al., 2017), que apontam o tipo túbulo-papilífero como o mais frequente, com percentual de 46,5% que está próximo ao encontrado neste estudo. O mesmo é corroborado em outro estudo que afirmou ter diagnosticado cerca de 50% dos carcinomas mamários na gata como túbulo-papilífero (DIAS PEREIRA; CARVALHEIRA; GÄRTNER, 2004).

Na histologia a graduação histopatológica faz referência a diferenciação comparando a semelhança das células do tumor com o tecido original, assim quanto maior o grau menor a diferenciação, sendo esperado maior agressividade (GOLDSCHMIDT et al., 2011; MISDORP, 2008; YAMAGAMI et al., 1996). A inclusão de novos critérios, como a presença ou a ausência de embolia neoplásica, e a avaliação diferenciada das alterações morfológicas nucleares pode representar uma nova proposta para graduar o carcinoma mamário felino (MILLS et al., 2015). No entanto o Sistema de Nottingham (ELSTON, C.W.; ELLIS, 1991) assume a invasão vascular como um critério a parte sendo as anormalidades referentes a forma, tamanho e condensação da cromatina inclusas e interpretadas em escores. Ainda é o mais utilizado pelo meio científico justificando o método escolhido (DE CAMPOS et al., 2015; NARDI et al., 2018). A agressividade pode ser observada na alta incidência de neoplasias pouco diferenciadas, menos de um décimo das amostras analisadas foram GI, mais de 40% eram GII e quase metade delas foi classificadas como GIII. A literatura aponta cerca de 5% de incidência para GI, 47% para GII e incidência semelhante aos achados de neoplasias de GIII (48%) (SEIXAS et al., 2011).

Conforme o esperado os tipos mais diferenciados que receberam classificação GI foram do tipo histopatológico menos agressivo, o túbulo-papilífero. A semelhança do anterior, a moderada diferenciação de GII, foi encontrada em todos os grupos, porém mais de dois terços delas foram observadas nos túbulo-papilífero. Já as amostras pouco diferenciadas (GIII) foram encontradas apenas nos tipos mais agressivos, sólido e cribriforme. Dados que se assemelham aos relatados por Seixas et al. (2011). O índice de incidência menor nos cribriformes pode ser justificado pelo baixo número de amostras deste tipo. Resultados que reforçam a relação de que quanto maior a agressividade, menor é a diferenciação.

A embolia vascular foi encontrada em quase um terço das amostras, todas GII e GIII. Este critério de agressividade foi observado nos tumores de menor diferenciação perante grau,

o que está dentro do esperado (MILLS et al., 2015), porém chama a atenção o índice relativamente alto no tipo histopatológico túbulo-papilífero, o que diverge da literatura, que relata ser um critério presente nos tumores mais agressivos (SOARES et al., 2016b).

O IM relaciona-se ao tempo médio de sobrevida (ZAPPULLI et al., 2014) e também ao tempo livre da doença (SARLI et al., 2003). Deve-se ressaltar que este método emprega colorações de rotina, sendo pouco dispendioso. Uma crítica ao IM é de não permitir uma avaliação abrangente e fidedigna do fenômeno proliferativo da neoplasia, uma vez que o período de mitose é muito curto dentro do ciclo celular, subestimando a proliferação (GRIFFEY; KRAEGEL; MADEWELL, 1999). Apenas 19% das amostras obtiveram baixo e moderado índice mitótico (IM 1 e IM 2) todas túbulo-papilífero. Os tipos sólido e cribriforme manifestaram IM 3, reforçando a agressividade dos tumores originados da hiperplasia epitelial assim como da hiperplasia associado a hipertrofia lobular (HUGHES; DOBSON, 2012). Mais da metade das amostras túbulo-papilífero tiveram IM 3 destoando do encontrado na literatura (SEIXAS et al., 2011).

O valor médio estabelecido neste estudo para o índice proliferativo em carcinoma mamário de gatas foi de 35%, superior ao descrito na literatura, onde o valor médio sugerido é de 20% (MORRIS et al., 2008), 25% (ZAPPULLI et al., 2014) e 29,8% (RASOTTO et al., 2011), a metodologia empregada foi semelhante a estes estudos. Em mulheres, outro trabalho aponta a dificuldade em estabelecer nota de corte para o IP, com resultados que variam de 13 a 44% (FOCKE; VAN DIEST; DECKER, 2016). Não foi encontrada diferença significativa entre os diferentes tipos e graduações, embora estudos mostrem significância entre graus (BARBIERI et al., 2012; DE CAMPOS et al., 2015). Quanto maior o IP, maior a agressividade tumoral (ZAPPULLI et al., 2014), o que corrobora aos resultados obtidos neste estudo, onde os tipos histopatológicos com os maiores índices foram encontrados nos de menor diferenciação (sólido e cribriforme). No entanto os túbulo-papilífero apresentaram média acima do dobro da nota de corte (SOARES et al., 2016a). Quanto à graduação o mesmo pode ser dito, sendo os maiores IP nos GII e GIII. O valor de nota de corte instituído como $IP \geq 14\%$ indica elevado risco de progressão tumoral, observado em tumores de pobre diferenciação, grande tamanho ($> 3\text{cm}$), extensas áreas de necrose, alteração na expressão hormonal e de fator de crescimento epidermal (HER-2), e ainda, a baixa sobrevida (SOARES et al., 2016b). Tal nota de corte é referenciada nos consensus sobre carcinoma mamário em gatas (NARDI et al., 2018; SOARES et al., 2016c).

Proliferação descontrolada é um dos mecanismos de evasão manifestado pela célula cancerígena, considerado um hallmark (DOWSETT et al., 2011). O IP foi indicativo de

sobrevida como superior ou inferior a um ano em felinas submetidas à mastectomia radical em isolado (HUGHES; DOBSON, 2012). Ambos os índices, mitótico e proliferativo são fatores prognóstico (CASTAGNARO et al., 1998; PREZIOSI et al., 2002; SEIXAS et al., 2011). Como o IP possui relação com o grau histopatológico, espera-se que quanto maior o grau da neoplasia mamária, maior seja a quantidade de células marcadas com Ki-67. A marcação é mais acentuada em tumores malignos quando comparada a benignos, estabelecido como um dos critérios de obtenção da nota de corte (MORRIS, et al., 2008). Em mulheres a nota estabelecida para o câncer de mama é de 14%, fundamental à escolha terapêutica (GOLDHIRSCH et al., 2013; TYAGI; DHESY-THIND, 2018). Mesmo com o valor de corte do IP instituído, há trabalhos que questionam este percentual apresentando valores variáveis como 25% (SPYRATOS et al., 2002) e 10% (DE AZAMBUJA et al., 2007). O que aponta uma limitação, assim como seu custo para uso em rotina (PETRIC et al., 2014). Isto se deve a pobre concordância no uso clínico preciso do ki-67; a sua substancial heterogenicidade; e a grande variabilidade dos métodos de avaliação validados (DOWSETT et al., 2011).

Atrelado aos altos índices proliferativos, o fenômeno da apoptose, tende a ser diminuído no carcinoma mamário felino, o que pode contribuir ainda mais para o desenvolvimento tumoral acelerado, potencializando o fenótipo invasor (SILVA et al., 2017). Isto também é observado em mulheres portadoras de carcinomas mais invasivos, que associa a debilitação da apoptose a manutenção da proliferação, contribuindo com a carcinogênese e a progressão tumoral (MOMMERS et al., 1999). O que reforça a importância do índice proliferativo como forte ferramenta para prognóstico do carcinoma mamário nas gatas.

CONCLUSÃO

A imuno-histoquímica se mostrou o método mais eficaz para predizer a proliferação celular, pois o IP avaliou de forma mais fidedigna o fenômeno da proliferação celular, que é subjugado pela interpretação do IM. A graduação histopatológica demonstrou ser mais importante que a classificação de tipos, pois teve melhor representatividade do potencial infiltrativo e metastático. Porém, a discrepância dos valores de nota de corte do IP sugere realização de novos estudos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, F. V. et al. Clinical, cytological and histopathological evaluation of mammary

masses in cats from Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 8, n. 6, p. 379–388, 2006.

BACUS, S. S. et al. Biological grading of breast cancer using antibodies to proliferating cells and other markers. **The American journal of pathology**, v. 135, n. 5, p. 783–92, 1989.

BARBIERI, F. et al. Isolation of stem-like cells from spontaneous feline mammary carcinomas: Phenotypic characterization and tumorigenic potential. **Experimental Cell Research**, v. 318, n. 7, p. 847–860, 2012.

CASTAGNARO, M. et al. Ki-67 index as indicator of the post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. **Research in Veterinary Science**, v. 65, n. 3, p. 223–226, 1998.

CATTORETTI, G. et al. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. **The Journal of Pathology**, v. 168, n. 4, p. 357–363, 17 set. 1992.

DE AZAMBUJA, E. et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: A meta-analysis of published studies involving 12 155 patients. **British Journal of Cancer**, v. 96, n. 10, p. 1504–1513, 2007.

DE CAMPOS, C. B. et al. Evaluation of prognostic factors and survival rates in malignant feline mammary gland neoplasms. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 18, n. 12, p. 1003–1012, 2015.

DIAS PEREIRA, P.; CARVALHEIRA, J.; GÄRTNER, F. Cell proliferation in feline normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissue - An immunohistochemical study. **Veterinary Journal**, v. 168, n. 2, p. 180–185, 2004.

DOWSETT, M. et al. Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Recommendations from the international Ki67 in breast cancer working Group. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 103, n. 22, p. 1656–1664, 2011.

ELSTON, C.W.; ELLIS, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of

histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**, v. 19, p. 403–410, 1991.

FOCKE, C. M.; VAN DIEST, P. J.; DECKER, T. St Gallen 2015 subtyping of luminal breast cancers: impact of different Ki67-based proliferation assessment methods. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 159, n. 2, p. 257–263, 2016.

GERDES, J. et al. Proliferation marker Ki-67: correlation with histological diagnosis, neoplasm grading and clinical course. **Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie**, v. 70, p. 152–8, 1986.

GOLDHIRSCH, A. et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: Highlights of the st gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast Cancer 2013. **Annals of Oncology**, v. 24, n. 9, p. 2206–2223, 2013.

GOLDSCHMIDT, M. et al. Classification and Grading of Canine Mammary Tumors. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 117–131, 1 jan. 2011.

GRIFFEY, S. M.; KRAEGEL, S. A.; MADEWELL, B. R. Proliferation Indices in Spontaneous Canine Lung Cancer: Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), Ki-67 (MIB1) and Mitotic Counts. **Journal of Comparative Pathology**, v. 120, n. 4, p. 321–332, 1 maio 1999.

GUNASINGHE, N. P. A. D. et al. Mesenchymal-epithelial transition (MET) as a mechanism for metastatic colonisation in breast cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 31, n. 3–4, p. 469–478, 2012.

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

HAYES, H. M.; MILNE, K. L.; MANDELL, C. P. Epidemiological features of feline mammary carcinoma. **The Veterinary record**, v. 108, n. 22, p. 476–9, 30 maio 1981.

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

MACEWEN, E. G. et al. Prognostic factors for feline mammary tumors. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 185, n. 2, p. 201–204, 1984.

MARIA, R. DE et al. Spontaneous Feline Mammary Carcinoma Is a Model of HER2 Overexpressing Poor Prognosis Human Breast Cancer. **Cancer Research**, v. 65, n. 3, p. 907–912, 2005.

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

MILLS, S. W. et al. Prognostic Value of Histologic Grading for Feline Mammary Carcinoma: A Retrospective Survival Analysis. **Veterinary Pathology**, v. 52, n. 2, p. 238–249, 2015.

MISDORP, W. et al. **Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat**. [s.l.] Armed Forces Institute of Pathology, 1999.

MISDORP, W. Tumors of the Mammary Gland. In: **Tumors in Domestic Animals**. Ames, Iowa, USA: Iowa State Press, 2008. p. 575–606.

MOMMERS, E. C. M. et al. Balance of cell proliferation and apoptosis in breast carcinogenesis. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 58, n. 2, p. 163–169, 1999.

MORRIS, J. S. et al. Expression of TopBP1 in canine mammary neoplasia in relation to histological type, Ki67, ER α and p53. **Veterinary Journal**, v. 175, n. 3, p. 218–226, 2008.

NARDI, A. B. D. E. et al. Consensus for the diagnosis , prognosis and treatment of feline mammary tumors. n. 2014, p. 1–17, 2018.

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

PETRIC, M. et al. Correlation between Ki67 and histological grade in breast cancer patients treated with preoperative chemotherapy. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, v. 15, n. 23, p. 10277–10280, 2014.

PREZIOSI, R. et al. Multiparametric survival analysis of histological stage and proliferative activity in feline mammary carcinomas. **Research in Veterinary Science**, v. 73, n. 1, p. 53–60, 2002.

RASOTTO, R. et al. An Immunohistochemical Study of HER-2 Expression in Feline Mammary Tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 144, n. 2, p. 170–179, 2011.

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

SARLI, G. et al. Evaluating mitotic activity in canine and feline solid tumors: Standardizing the parameter. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 74, n. 2, p. 64–76, 1999.

SARLI, G. et al. Rate of apoptosis in feline mammary tumors is not predictive of postsurgical survival. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, n. 2, p. 115–122, 2003.

SEIXAS, F. et al. Grade is an independent prognostic factor for feline mammary carcinomas: A clinicopathological and survival analysis. **Veterinary Journal**, v. 187, n. 1, p. 65–71, 2011.

SILVA, M. N. et al. Histologic evaluation of Ki-67 and cleaved caspase-3 expression in feline mammary carcinoma. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 19, n. 4, p. 440–445, 2017.

SOARES, M. et al. Ki-67 as a Prognostic Factor in Feline Mammary Carcinoma: What Is the Optimal Cutoff Value? **Veterinary Pathology**, v. 53, n. 1, p. 37–43, 2016a.

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

SOARES, M. et al. St Gallen molecular subtypes in feline mammary carcinoma and paired metastases—disease progression and clinical implications from a 3-year follow-up study. **Tumor Biology**, v. 37, n. 3, p. 4053–4064, 2016c.

SORENMO KU, WORLEY DR, G. M. Tumors of mammary gland. In: Withrow SJ, Vail DM, Page RL. In: **Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. 3 ed.** [s.l.: s.n.]. p. 538–56.

SPYRATOS, F. et al. Correlation between MIB-1 and other proliferation markers. **Cancer**, v. 94, n. 8, p. 2151–2159, 15 abr. 2002.

TAMAMOTO, T. et al. Serum Amyloid A Promotes Invasion of Feline Mammary Carcinoma Cells. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 76, n. 8, p. 1183–1188, 2014.

TYAGI, N. K.; DHESY-THIND, S. Clinical practice guidelines in breast cancer. **Current Oncology**, v. 25, n. Suppl 1, p. S151–S160, 13 jun. 2018.

WINTZER, H. -O et al. Ki-67 immunostaining in human breast tumors and its relationship to prognosis. **Cancer**, v. 67, n. 2, p. 421–428, 1991.

YAMAGAMI, T. et al. Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification. **The Journal of veterinary medical science**, v. 58, n. 11, p. 1079–83, nov. 1996.

ZAPPULLI, V. et al. Feline mammary tumours in comparative oncology. **Journal of Dairy Research**, v. 72, n. SPEC. ISS., p. 98–106, 2005.

ZAPPULLI, V. et al. Prognostic Evaluation of Feline Mammary Carcinomas: A Review of the Literature. **Veterinary Pathology**, v. 52, n. 1, p. 46–60, 16 abr. 2014.