

Fernanda Aurora Gomes de Seixas Travassos

LESÕES MAMÁRIAS FELINAS

Contributo para a sua caracterização biopatológica

Orientador científico: Professor Doutor Carlos da Silva Lopes

Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto

Co-orientador científico: Professora Doutora Maria dos Anjos Pires

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Departamento de Ciências Veterinárias

Este trabalho foi financiado no âmbito do PRODEP III

Concurso n.º 2/5.3/PRODEP/2001

Formação Avançada de Docentes no Ensino Superior

Formando n.º 24



Tese de candidatura ao grau de doutor, de acordo com o disposto no nº 1 do artigo 17º do Decreto-Lei nº216/92 de 13 de Outubro.

RESUMO

De entre as neoplasias da mama da gata, os carcinomas são os mais frequentes, sendo reconhecidos pela sua alta agressividade biológica e mau prognóstico. Tendo em conta a escassez de critérios morfológicos e biológicos com valor prognóstico comprovado para estas neoplasias, pretendemos com este estudo, contribuir à identificação dos factores mais significativos para avaliar o comportamento mais ou menos agressivo destas neoplasias. Foi ainda objectivo major melhorar o sistema de classificação histológica existente, dadas as suas insuficiências práticas de aplicação universal e reprodutível.

Foram analisados 130 nódulos mamários, caracterizados de acordo com a frequência e com os parâmetros clinico-patológicos. Para a caracterização das lesões recorremos à histologia convencional, a técnicas de coloração e imuno-histoquímica para a vimentina, marcadores de diferenciação mioepitelial (CK14, p63, calponina), caderina E e β -catenina, MMP1, MMP2, TIMP1, VEGF, HER-2/*neu*; foi ainda efectuado o estudo da ploidia de ADN e parâmetros associados. Foi também realizado um estudo de seguimento para aferir melhor os parâmetros de prognóstico em análise uni e multivariada.

Os carcinomas de mama surgiram principalmente em gatas de idade média a avançada e apresentaram aspectos macro e microscópicos diversos. Além de carcinomas ductais sem características específicas, foram identificados grupos de carcinomas invasores com características bifásicas (carcinomas epiteliais-mioepiteliais), com elementos metaplásicos, epidermóides e/ou heterólogos (carcinomas metaplásicos) e com predomínio do padrão micropapilar (carcinoma micropapilar). O carcinoma epitelial-mioepitelial evidenciou características de baixa agressividade biológica: baixo grau histológico e nuclear, índices proliferativos baixos, fenótipo preservado de caderina E e β -catenina, baixa expressão de MMP1, TIMP1, VEGF, HER-2, conteúdo de ADN diplóide e os melhores tempos de sobrevivência livre de doença e total. Por oposição salientaram-se os carcinomas metaplásicos e micropapilares, associados a critérios histológicos clássicos de agressividade biológica, fenótipo reduzido das moléculas de adesão, expressão alta dos marcadores imunohistoquímicos, conteúdo de ADN aberrante e baixos tempos de sobrevivência. Os carcinomas invasores sem tipo específico revelaram-se um grupo heterogéneo, com características histológicas, imuno-histoquímicas, ploidia de ADN e tempos de sobrevivência variáveis.

Foram critérios de prognóstico independente para a sobrevivência total o grau histológico e a ocorrência de metástases no momento da exérese e, para a sobrevivência livre de doença o grau histológico e a permeação vascular. No grupo das gatas sem

metástases ganglionares (N_0) foram critérios de prognóstico independente o tamanho, o tipo e o grau histológico, com as gatas com carcinomas metaplásicos e micropapilares a evidenciarem um aumento substancial de risco de morte por doença oncológica.

Estes resultados demonstram claramente que existem tipos histológicos de carcinomas com agressividade biológica distinta, que devem ser incluídos na classificação dos carcinomas da gata. Demonstram ainda a importância da graduação histológica na avaliação destas neoplasias.

SUMMARY

Carcinomas are the most frequent neoplasia of feline mammary gland, known for its biological aggressiveness and bad prognosis. The prognostic value of morphologic and biological parameters in this species is unknown; therefore, the objective of this study was to identify the factors that affect the behaviour and natural history of feline neoplasias. Additionally, since there is no universal consensus regarding the current World Health Organization classification of feline mammary tumours, we propose a new classification system.

The frequency and clinicopathological parameters of 130 mammary nodules were observed and classified. Mammary changes and neoplasias were characterized using conventional histology, histochemistry and immunohistochemistry techniques using antibodies against vimentin, myoepithelial markers (CK14, p63, calponin), E-cadherin and β -catenin, MMP1, MMP2, TIMP1, VEGF, HER-2/neu; we also evaluated the nuclear DNA content and associated cytometric parameters. A disease-free survival and overall survival using univariate and multivariate analysis were conducted in order to determine the effect of the clinicopathological parameters in the prognosis.

Carcinomas affected mainly middle age to elderly females and presented variable macro and microscopical features. We identified invasive ductal carcinoma of not otherwise specified type (ductal NOS), and specific types of tumours: biphasic carcinomas (epithelial-myoepithelial carcinomas), metaplastic carcinomas (presenting squamous and/or heterologous mesenchymal differentiation), and micropapillary carcinomas.

Epithelial-myoepithelial carcinoma were associated to histologic features of low biological aggressiveness: they were low grade, low proliferating tumours, with scanty nuclear pleomorphism, preserved phenotype of E-cadherin and β -catenin, and low immunoexpression rates of MMP1, TIMP1, VEGF, HER-2. Most lesions were DNA diploid. This tumour type presented good disease-free survival and overall survival. On the other hand, metaplastic and micropapillary carcinomas were more likely to be poorly differentiated, and to behave aggressively; they presented reduced levels of adhesion molecules, high immunoreactivity indices, abnormal DNA content and low overall survival and disease-free survival. Ductal NOS was a heterogeneous tumour group, presenting diverse histology, immunohistochemistry pattern, and DNA ploidy. The overall survival and disease-free survival were also variable.

In multivariate analysis the traditional pathological parameters of lymph node status, tumour size, histological type, and histological grade were the most useful prognostic

factors: histological grade and lymph node status had independent significance for overall survival; histological grade and lymphovascular invasion achieved statistical significance for disease-free survival. In lymph node negative queens, larger size, histological type and high histological grade were associated with an adverse outcome. Among the histological types, metaplastic and micropapillary carcinomas exhibited a more aggressive behaviour and a greater risk of death by mammary cancer than the other types of tumours.

These results clearly demonstrate that these histological types have diverse degrees of biological aggressiveness; thus they should be included in a new classification system of the feline mammary lesions. They also prove histological grade to be a reliable prognostic factor, identifying queens at greater risk of lymph node involvement and an adverse outcome.

Ao Paulo e ao Mário
À minha família

AGRADECIMENTOS

Constituindo a presente dissertação o resultado de um labor individual, esta só foi possível devido à dedicação de pessoas e instituições que desinteressadamente nos apoiaram. A elas a expressão do nosso agradecimento sincero:

À Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, na pessoa do Magnífico Reitor, queremos exprimir o nosso agradecimento por nos ter possibilitado a realização desta tese.

Ao Senhor Professor Doutor Carlos Lopes, orientador científico da nossa dissertação, personalidade de elevado valor humano e rigor científico. A sua visão dinâmica da oncologia, entusiasmo e abertura a novas tecnologias, sempre nos estimulou a ir mais além na aquisição de conhecimentos de oncobiologia.

À Senhora Professora Doutora Maria dos Anjos Pires, co-orientadora deste projecto, exprimimos o nosso reconhecimento pela sua presença e amizade constantes, conhecimentos que nos transmitiu, e pela disponibilização de meios materiais e humanos. É verdadeiramente um exemplo de amizade e de abertura à ciência.

Ao Laboratório de Imunologia Celular do IPO - Porto na pessoa da Senhora Dra Gabriela Martins agradecemos a possibilidade da utilização do citómetro de imagem.

Ao Senhor Dr. Carlos Palmeira não podia deixar de reconhecer a amizade e toda a colaboração na realização da técnica de Citometria de Imagem, sugestões sempre pertinentes e incentivo na realização deste trabalho.

A todos os elementos dos Laboratório de Anatomia Patológica do IPO-Porto, agradecemos a simpatia com que sempre nos acolheram. Um agradecimento especial à Senhora D. Angela e Senhora D. Paula pela disponibilidade e esclarecimentos prestados na realização das técnicas de imuno-histoquímica, e à Senhora D. Fernanda pelas palavras de incentivo e amizade.

Não podemos deixar de exprimir a nossa gratidão aos vários patologistas do Serviço de Anatomia Patológica do IPO-Porto, em particular à Senhora Dr^a. Conceição Leal pela cedência de material bibliográfico. À Senhora Dr^a Isabel Macedo Pinto, directora do Serviço de Anatomia Patológica agradecemos a cedência de lâminas de controlo para os estudos do HER-2/*neu*.

Ao Laboratório de Genética Molecular do IPO - Porto na pessoa do Senhor Professor Doutor Manuel Teixeira agradecemos a possibilidade de acompanhar a realização da técnica de FISH. Um agradecimento particular à Senhora Dr^a Susana Lisboa pela simpatia e disponibilidade sempre manifestadas.

À Senhora Dr^a Maria José Bento do Serviço de Epidemiologia do IPO - Porto e ao Senhor Professor Doutor Jorge Colaço do Departamento de Zootecnia da UTAD agradecemos toda a colaboração no tratamento estatístico dos dados.

Ao Senhor Professor Doutor Jorge Rodrigues, coordenador do Departamento de Ciências Veterinárias, agradecemos as facilidades concedidas para a elaboração deste trabalho.

Ao Laboratório de Genética e Biotecnologia da UTAD, na pessoa do seu responsável Senhor Professor Doutor Henrique Guedes Pinto, agradecemos a colaboração prestada.

Às colegas do Laboratório de Histologia e Anatomia Patológica agradecemos toda a colaboração. À Senhora Professora Doutora Anabela Alves agradecemos a flexibilidade no horário das aulas práticas de Anatomia Patológica. À Senhora Professora Doutora Isabel Pires agradecemos a cedência do programa estatístico SPSS, de material bibliográfico e todo o apoio. Não podia deixar de salientar toda a colaboração da Senhora Dr^a Justina Oliveira na realização da técnica de imuno-histoquímica e na actividade docente.

Às Senhoras Dr^{as} Adelina Gama e Maria de Lurdes Pinto, amigas incomparáveis, agradecemos a disponibilidade sempre presente para ouvir e discutir a classificação das lesões, dos resultados, pelo carinho e encorajamento constantes. A elas o nosso muito obrigado.

À Senhora Dr^a Paula Oliveira, agradecemos a disponibilidade sempre manifestada. A sua amizade foi uma agradável surpresa...

Às funcionárias do Laboratório de Histologia e Anatomia Patológica da UTAD, Senhora D. Lúcia Bento, Senhora D. Ana Plácido e Senhora D. Glória Milagres, agradecemos toda a colaboração e disponibilidade.

Aos colegas das várias Clínicas e Hospitais Veterinários e aos proprietários dos animais que gentilmente contribuíram com informações sobre os animais, o nosso obrigado.

À nossa família e amigos agradecemos o carinho e paciência nos momentos de ausência. Em particular ao Mário e ao Paulo por serem a nossa força motriz...

A todos quanto contribuíram para a realização deste trabalho, o nosso muito obrigado.

ÍNDICE

RESUMO	VII
SUMMARY	IX
ÍNDICE	XV
ÍNDICE DE FIGURAS	XIX
ÍNDICE DE QUADROS	XXIII
ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS E SIGLAS	XXV
INTRODUÇÃO	1
OBJECTIVOS	9
MATERIAL E MÉTODOS	13
MATERIAL	15
ESTUDO DAS VARIÁVEIS CLÍNICO-PATOLÓGICAS	15
AVALIAÇÃO CLÍNICA	15
ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	15
- Padrão morfológico	17
- Tipo histológico	17
- Grau histológico	18
- Estadio	18
Colorações e métodos histoquímicos	19
Estudos de Imuno-histoquímica	19
Métodos de quantificação da imunoreactividade	20
ANÁLISE DO CONTEÚDO DE ADN POR CITOMETRIA DE IMAGEM	23
Procedimento	23
Quantificação do conteúdo de ADN nuclear	23
ESTUDO DE SOBREVIVÊNCIA	25
ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
RESULTADOS	27
I. CARACTERIZAÇÃO CLÍNICO-PATOLÓGICA	29
Raça e idade	29
Número, localização e dimensões	29
Contracepção	30
Ulceração cutânea	30
II. CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA	30
1. CARCINOMAS FELINOS	30
ASPECTO MACROSCÓPICO	31
PARÂMETROS MICROSCÓPICOS	31
Padrões arquiteturais	31
Tipo histológico	36
• Carcinoma ductal “ in situ” (CDIS)	36
• Carcinoma ductal invasor sem tipo específico (CDI-STE)	36
• Carcinomas epiteliais-mioepiteliais (CEM)	38
• Carcinomas metaplásicos	39
• Carcinomas micropapilares invasores	40
1.1. ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS DIFERENTES CARCINOMAS	40
TIPO HISTOLÓGICO E CRITÉRIOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS	53

ÍNDICES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E COMPORTAMENTO BIOLÓGICO.....	55
CARACTERIZAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA	58
Vimentina, panqueratina e marcadores de diferenciação mioepitelial (CK14, p63 e calponina).....	58
Caderina E e β -catenina.....	60
Metaloproteinase da matriz 1 (MMP1), MMP2 e inibidor das metaloproteinases da matriz 1 (TIMP1).....	71
VEGF	72
HER-2/neu.....	73
Receptores de Estrogênio e Progesterona.....	75
1.2. ESTUDO COMPARATIVO ENTRE CARCINOMAS COM (N1) E SEM ENVOLVIMENTO GANGLIONAR (N0)	76
1.3. ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS CARCINOMAS E AS SUAS METÁSTASES.....	77
ÍNDICES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E COMPORTAMENTO BIOLÓGICO.....	77
EXPRESSÃO DOS MARCADORES IMUNO-HISTOQUÍMICOS.....	78
2. OUTRAS PROLIFERAÇÕES E LESÕES MAMÁRIAS OBSERVADAS	79
2.1 ALTERAÇÕES PROLIFERATIVAS NÃO NEOPLÁSICAS.....	79
Alteração fibroquística (AFQ).....	79
Alteração fibroadenomatosa total (AFT).....	79
2.2. NEOPLASIAS BENIGNAS	80
Adenoma tubular	80
Adenoma epitelial-mioepitelial (adenoma complexo).....	80
Papiloma.....	81
Fibroadenoma.....	81
3. ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS CARCINOMAS E OS OUTROS TIPOS HISTOLÓGICOS.....	87
VARIÁVEIS CLÍNICO-PATOLÓGICAS E COMPORTAMENTO BIOLÓGICO.....	87
PROLIFERAÇÃO CELULAR E COMPORTAMENTO BIOLÓGICO	89
COMPARAÇÃO DO TIPO HISTOLÓGICO COM AS VARIÁVEIS IMUNO-HISTOQUÍMICAS.....	91
4. ESTUDO DA MAMA ADJACENTE AOS CARCINOMAS.....	93
5. COMPARAÇÃO DA MAMA ADJACENTE A CARCINOMAS COM A MAMA NÃO ASSOCIADA A NEOPLASIAS.....	94
Alteração fibroquística (AFQ).....	94
CDIS.....	95
6. ESTUDO DE SOBREVIVÊNCIA.....	96
I. SOBREVIVÊNCIA TOTAL (ST).....	96
ASSOCIAÇÃO ENTRE A SOBREVIVÊNCIA TOTAL E OS PARÂMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS E IMUNO-HISTOQUÍMICOS.....	96
II. SOBREVIVÊNCIA LIVRE DE DOENÇA (SLD).....	103
ASSOCIAÇÃO ENTRE A SOBREVIVÊNCIA LIVRE DE DOENÇA E OS PARÂMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS E IMUNO-HISTOQUÍMICOS	103
III. ANÁLISE MULTIVARIADA DA SOBREVIVÊNCIA	108
IV. ESTUDO DE SOBREVIVÊNCIA EM GATAS COM GÂNGLIOS LINFÁTICOS NEGATIVOS (N0).....	110
ANÁLISE MULTIVARIADA DA SOBREVIVÊNCIA TOTAL EM GATAS N0.....	112
7. ANÁLISE DO CONTEÚDO DE ADN POR CITOMETRIA DE IMAGEM.....	112
I. CARCINOMAS	112
PLOIDIA DE ADN.....	112
ASSOCIAÇÃO DA PLOIDIA DE ADN COM OS CRITÉRIOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS E IMUNO-HISTOQUÍMICOS	112
ASSOCIAÇÃO DA PLOIDIA DE ADN COM OS ÍNDICES DE PROLIFERAÇÃO	113

ASSOCIAÇÃO DA PLOIDIA DE ADN COM AS VARIÁVEIS IMUNO-HISTOQUÍMICAS.....	115
FRACÇÃO DE CÉLULAS VERDADEIRAMENTE ANEUPLÓIDES (5cER)	116
II. ESTUDO CITOMÉTRICO DOS TUMORES PRIMÁRIOS E SUAS METÁSTASES	118
III. ESTUDO CITOMÉTRICO DA MAMA ADJACENTE AOS CARCINOMAS.....	118
Alterações fibroquísticas (AFQs)	118
CDIS.....	118
IV. ASSOCIAÇÃO DOS PARÂMETROS CITOMÉTRICOS COM A SOBREVIVÊNCIA	120
Ploidia de ADN	120
Fracção 5cER	120
Associação da fracção 5cER com a sobrevivência em gatas com carcinomas diplóides	122
Associação dos parâmetros citométricos com a sobrevivência em gatas N0	122
Análise multivariada.....	123
DISCUSSÃO.....	125
CONCLUSÕES.....	167
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	173
ANEXOS	

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Gata com lesões mamárias múltiplas afectando as 2 cadeias mamárias.....	32
Fig. 2. Lesão de grandes dimensões, ulcerada, envolvendo as mamas abdominal (nº3) e inguinal (nº4).....	32
Fig. 3: Gata com metástases de carcinoma de mama no pulmão, pericárdio e mediastino com efusão pleural.....	33
Fig. 4: Metástases pulmonares	33
Fig. 5: Metástases renais bilaterais de carcinoma de mama	34
Fig. 6. Metástase cerebral.....	34
Fig.7. Secção transversal de neoplasia mamária com áreas quísticas e conteúdo gelatinoso	35
Fig. 8. Padrões arquitecturais predominantes nos vários tipos histológicos	35
Fig. 9. Carcinoma papilar in situ. Estalão = 300 µm	41
Fig. 10. Carcinoma ductal invasor sem tipo específico (CDI-STE) evidenciando 2 populações celulares, uma basófila, outra acidófila.....	41
Fig. 11. CDI-STE com áreas cribriformes. Estalão = 60 µm.....	42
Fig. 12. CDI-STE com abundante produção de mucinas. Estalão = 60 µm.....	42
Fig. 13. CDI-STE com áreas glomerulóides, micropapilares. Estalão = 60 µm	43
Fig. 14. CDI-STE de padrão sólido e alto grau histológico. Estalão = 30 µm.....	43
Fig. 15. CDI-STE de padrão quístico. Estalão = 300 µm	44
Fig. 16. CDI-STE de padrão túbulo-papilar. Estalão = 30 µm	44
Fig. 17. Grau nuclear e grau histológico dos CDI-STE.....	37
Fig. 18. CDI-STE de alto grau histológico com áreas de necrose de tipo comedo. Estalão = 300 µm; Estalão insert = 30 µm	45
Fig. 19. CDI-STE com áreas de diferenciação epidermóide. Estalão = 60 µm.....	45
Fig. 20. CDI-STE de padrão sólido com células de citoplasma clarificado e presença de células gigantes multinucleadas de tipo osteoclasto. Estalão = 60 µm	46
Fig. 21. CEM evidenciando limites bem definidos e crescimento expansivo. Estalão = 300 µm.....	46
Fig. 22. CEM evidenciando áreas tubulares e estroma escasso. Estalão = 60 µm	47
Fig. 23. Outro aspecto do CEM anterior evidenciando abundante população fusocelular de natureza mioepitelial. Estalão = 60 µm.....	47
Fig. 24. CEM evidenciando elevado número de células mioepiteliais de citoplasma acidófilo, algumas em mitose. Estalão = 30 µm.....	48
Fig. 25. CEM apresentando estroma escasso e células gigantes multinucleadas. Estalão = 30 µm.....	48
Fig. 26. Carcinoma metaplásico apresentando áreas epidermóides e condróides mesenquimatosas. Estalão = 300 µm	49
Fig. 27. Carcinoma metaplásico evidenciando ninhos de invasão e estroma desmoplásico. Estalão = 60 µm.	49
Fig. 28. Carcinoma metaplásico evidenciando áreas de cartilagem mesenquimatosa. Estalão = 30 µm. Estalão insert = 30 µm	50
Fig. 29. Carcinoma de células fusiformes de alto grau nuclear com disposição fascicular. Estalão = 60 µm.	50
Fig. 30. Carcinoma de células fusiformes. Estalão = 60 µm	51
Fig. 31. Carcinoma micropapilar invasor evidenciando alto grau histológico e nuclear. Os agregados celulares encontram-se em lacunas mimetizando permeação linfática. Estalão = 60 µm. Estalão insert = 30 µm	51
Fig. 32. Pequenos aglomerados papilares (micropapilas) sem estroma conjuntivo. Estalão = 60 µm.....	52
Fig. 33. Êmbolos linfáticos de padrão micropapilar. Estalão = 120 µm.....	52
Fig. 34. Dimensão dos carcinomas.....	55
Fig. 35. Grau histológico dos carcinomas	55
Fig. 36. Variação do índice mitótico nos vários tipos histológicos	56
Fig. 37. Variação do índice de Ki-67 nos vários tipos histológicos.....	56
Fig. 38. Variação do índice mitótico com o grau histológico	57
Fig. 39 Variação do índice de antígeno Ki-67 com o grau histológico.....	57
Fig. 40. Fig. 40. Positividade ao antígeno Ki-67 num CDI-STE. Estalão = 60 µm.....	57
Fig. 41. CDI-STE evidenciando imunopositividade à CK14. Estalão = 60 µm.....	61

Fig. 42. Fig. 43. CEM evidenciando túbulos e cordões celulares rodeados por mioepitélio e células gigantes multinucleadas de tipo osteoclasto. Estalão = 30 µm.	61
Fig. 43. CEM evidenciando limite expansivo e extensa positividade à CK14. Estalão = 300 µm. Estalão insert = 60 µm.	62
Fig. 44. CEM evidenciando intensa positividade à calponina. Estalão = 120 µm.	62
Fig. 45. CEM evidenciando positividade basal/mioepitelial à proteína p63. Estalão = 30 µm.	63
Fig. 46. Carcinoma de células fusiformes evidenciando positividade à calponina. Estalão = 60 µm. Insert evidencia positividade de algumas células à proteína p63. Estalão insert = 20 µm.	63
Fig. 47. Carcinoma de células fusiformes apresentando forte positividade à vimentina. Estalão = 50 µm.	64
Fig. 48. Carcinoma metaplásico apresentando células positivas à proteína p63 no componente epitelial, na cartilagem e no estroma. Estalão = 30 µm.	64
Fig. 49. CDI-STE apresentando diminuição da expressão de caderina E relativamente à mama normal. Estalão = 20 µm.	65
Fig. 50. CDI-STE evidenciando expressão diminuída e aberrante de β -catenina. Estalão = 30 µm.	65
Fig. 51. Expressão de β -catenina num carcinoma metaplásico. Estalão = 30 µm.	66
Fig. 52. CDI-STE evidenciando extensa imunoreactividade à MMP1. Estalão = 60 µm.	66
Fig. 53. CDI-STE evidenciando extensa imunoreactividade à MMP2. Estalão = 60 µm.	67
Fig. 54. CDI-STE evidenciando extensa imunoreactividade à TIMP1. Estalão = 60 µm.	67
Fig. 55. CDI-STE evidenciando extensa imunoreactividade ao VEGF Estalão = 60 µm.	68
Fig. 56. carcinoma evidenciando expressão de HER-2/ <i>neu</i> de intensidade forte (3+) Estalão = 30 µm.	68
Fig. 57. Índice de VEGF nos vários tipos histológicos (p=0,01).	73
Fig. 58. Comparação do índice mitótico dos carcinomas N ₀ e N ₁	76
Fig. 59: Comparação do índice de Ki-67 dos carcinomas N ₀ e N ₁	76
Fig. 60. Expressão de VEGF em carcinomas N ₀ e N ₁	76
Fig. 61. Alteração fibroquística. Estalão = 300 µm.	82
Fig. 62. Gata jovem evidenciando alteração fibroadenomatosa total com envolvimento de várias glândulas mamárias	82
Fig. 63. Secção transversal de uma glândula mamária com alteração fibroadenomatosa total evidenciando áreas de hemorragia e necrose.	83
Fig. 64. Alteração fibroadenomatosa total evidenciando extensa ramificação ductal. Estalão = 300 µm.	83
Fig. 65. Alteração fibroadenomatosa total evidenciando imuno-expressão de MMP2. Estalão = 60 µm.	84
Fig. 66. Adenoma tubular. Estalão = 60 µm.	84
Fig. 67. Adenoma complexo. Estalão = 120 µm.	85
Fig. 68 Ampliação da lesão anterior evidenciando população mioepitelial abundante. Estalão = 30 µm.	85
Fig. 69. Papiloma de padrão invertido com células de citoplasma clarificado e células gigantes multinucleadas. Estalão = 300 µm. Estalão insert = 30 µm.	86
Fig. 70. Fibroadenoma com esclerose do estroma. Estalão = 300 µm.	86
Fig. 71. Comparação do índice mitótico nos 3 tipos de alteração da glândula mamária.	90
Fig. 72. Comparação do índice de Ki-67 nos 3 tipos de alteração da glândula mamária.	90
Fig. 73. Comparação do índice mitótico entre alterações fibroadenomatosas (AFT) e fibroadenomas.	90
Fig. 74. Comparação do índice de Ki-67 entre as alterações fibroadenomatosas (AFT) e as alterações fibroquísticas (AFQ).	90
Fig. 75 Expressão de MM2 nos vários tipos histológicos (p=0.006).	93
Fig. 76. Comparação do índice mitótico entre os carcinomas e as alterações mamárias presentes na sua periferia.	93
Fig. 77. Comparação do índice de Ki-67 entre os carcinomas e as alterações mamárias presentes na sua periferia.	93
Fig. 78. Associação da sobrevivência total com o tamanho dos carcinomas.	100
Fig. 79. Associação da sobrevivência total com o tipo histológico dos carcinomas.	100
Fig. 80. Associação da sobrevivência total com o grau histológico.	100
Fig. 81. Associação da sobrevivência total com o estadio.	100
Fig. 82. Associação da sobrevivência total com a permeação vascular.	101
Fig. 83. Associação da sobrevivência total com a metastização dos gânglios regionais.	101
Fig. 84. Associação da sobrevivência total com o índice mitótico.	101
Fig. 85. Associação da sobrevivência total com o índice de ki-67.	101
Fig. 86. Associação da sobrevivência livre de doença com o tamanho dos carcinomas.	106

Fig. 87 Associação da sobrevivência livre de doença com o tipo histológico	106
Fig. 88. Associação da sobrevivência livre de doença com o grau histológico	106
Fig. 89. Associação da sobrevivência livre de doença com o estadio.....	106
Fig. 90. Associação da sobrevivência livre de doença com a permeação vascular.....	107
Fig. 91. Associação da sobrevivência livre de doença com a metastização ganglionar.....	107
Fig. 92. Associação da sobrevivência livre de doença com o índice mitótico.....	107
Fig. 93. Associação da sobrevivência livre de doença com a expressão de HER-2/neu.....	107
Fig. 94. Associação da sobrevivência total com o tipo histológico em gatas N ₀	110
Fig. 95. Associação da sobrevivência livre de doença com o grau histológico em gatas N ₀	110
Fig. 96. Histograma aneuplóide de ADN.....	114
Fig. 97. Histograma diplóide de ADN.....	114
Fig 98. Associação entre a ploidia de ADN e o tipo histológico.....	114
Fig. 99 Associação da ploidia de ADN e o grau histológico (p=0,003)	114
Fig. 100. Histograma multiploide e de ADN.....	115
Fig. 101. Carcinoma de alto grau com conteúdo de ADN multiplóide. Estalão = 60 µm.....	115
Fig. 102. Associação entre a ploidia de ADN e o índice mitótico.....	115
Fig. 103. Associação entre a ploidia de ADN e o índice de Ki-67	115
Fig. 104. Associação da fracção 5cER com o tipo histológico.....	117
Fig. 105. Associação do valor da fracção 5c com a permeação vascular (p=0,036).....	117
Fig. 106. Ploidia de ADN dos carcinomas e das lesões presentes na sua periferia (p<0,0001).....	119
Fig. 107. Associação da ploidia de ADN com a sobrevivência total.....	121
Fig. 108. Associação da ploidia de ADN com a sobrevivência livre de doença.....	121
Fig. 109. Associação da fracção 5cER com a sobrevivência livre de doença.....	121
Fig. 110. Associação da sobrevivência total com a ploidia de ADN em gatas N ₀	121
Fig. 111. Carcinoma de mama de gata evidenciando aumento do sinal do gene HER-2/neu. Técnica de FISH	171
Fig. 112. Carcinoma de mama de mulher evidenciando amplificação de HER-2/neu. Técnica de FISH	171

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Parâmetros avaliados no exame de microscopia de luz dos nódulos mamários.....	16
Quadro 2. Estadio TNM.....	18
Quadro 3. Anticorpos primários e procedimentos informativos.....	20
Quadro 4. Avaliação da imunomarcção para os anticorpos Vimentina e CK14.....	21
Quadro 5. Graduação da imuno-expressão de HER-2/neu.....	23
Quadro 6. Frequências absolutas e relativas das alterações mamárias analisadas.....	29
Quadro 7. Tipo histológico dos carcinomas.....	36
Quadro 8. Associação entre a raça e a idade das gatas com neoplasias malignas.....	40
Quadro 9. Associação do tipo histológico com as variáveis clínico-patológicas.....	54
Quadro 10. Imuno-expressão de vimentina e de marcadores de diferenciação basal/mioepitelial nos CEMs.....	59
Quadro 11. Imuno-expressão de vimentina e de marcadores de diferenciação mioepitelial nos carcinomas metaplásicos....	60
Quadro 12. Imuno-expressão de Caderina E e β -catenina.....	69
Quadro 13. Associação do fenótipo reduzido e preservado de Caderina E e β -catenina e da relação Caderina E/ β -Catenina com os critérios clínico-patológicos clássicos.....	70
Quadro 14. Correlação do padrão de expressão de Caderina E e β -Catenina.....	70
Quadro 15. Associação da expressão de HER-2/neu com o tipo histológico ($p=0,05$).....	73
Quadro 16. Associação da expressão de HER-2/neu e as variáveis clínico-patológicas e imuno-histoquímicas.....	74
Quadro 17. Associação da expressão de HER-2/neu e os índices de proliferação.....	75
Quadro 18. Comparação dos índices de proliferação de tumores primários e secundários.....	77
Quadro 19. Associação das características clínico-patológicas com o tipo histológico.....	88
Quadro 20. Idade das gatas e tamanho dos nódulos mamários.....	87
Quadro 21. Análise comparativa dos índices de proliferação celular das alterações fibroadenomas e dos fibroadenomas nos componentes epitelial e estromal.....	91
Quadro 22. Associação das variáveis imuno-histoquímicas e o tipo histológico.....	91
Quadro 23. Comparação das variáveis imuno-histoquímicas entre os carcinomas e as alterações mamárias presentes na sua periferia.....	94
Quadro 24. Comparação das variáveis imuno-histoquímicas entre as alterações fibroquísticas solitárias e as presentes na periferia dos carcinomas.....	95
Quadro 25. Comparação dos índices proliferativos entre as alterações fibroquísticas solitárias e as presentes na periferia dos carcinomas.....	95
Quadro 26. Análise univariada da sobrevivência total e associação com as variáveis clínico-patológicas e imuno-histoquímicas.....	97
Quadro 27. Divisão dos carcinomas em muito e pouco proliferativos.....	102
Quadro 28. Análise univariada da sobrevivência livre de doença e sua associação com as variáveis clínico-patológicas e imuno-histoquímicas.....	104
Quadro 29. Análise multivariada relativa à sobrevivência total.....	109
Quadro 30. Análise multivariada relativa à sobrevivência livre de doença.....	109
Quadro 31. Análise multivariada relativa à sobrevivência total em gatas N_0	111
Quadro 32. Fração 5cER e ploidia de ADN.....	116
Quadro 33. Associação da fração 5cER com os índices de proliferação celular.....	117
Quadro 34. Comparação da ploidia de ADN e fração 5cER dos tumores primários e secundários.....	118
Quadro 35. Comparação da ploidia de ADN dos CDIS com a fração 5cER.....	119
Quadro 36. Comparação da ploidia de ADN e 5cER entre os carcinomas e as alterações mamárias adjacentes.....	119
Quadro 37. Associação da ploidia de ADN com a sobrevivência.....	120
Quadro 38. Associação da fração 5cER com a sobrevivência.....	120
Quadro 39. Associação da fração 5cER dos carcinomas diplóides de ADN com a sobrevivência.....	122
Quadro 40. Associação dos parâmetros citométricos com a sobrevivência total em gatas N_0	122
Quadro 41. Associação dos parâmetros citométricos com a sobrevivência livre de doença em gatas N_0	123

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS E SIGLAS

ADN - Ácido desoxirribonucleico.

AFQ - Alteração fibroquística da mama.

AFT - Alteração fibroadenomatosa total da mama.

ARN - Ácido ribonucleico.

ARNm - ARN mensageiro.

CEM - Carcinoma epitelial-mioepitelial

CDIS - Carcinoma ductal *in situ*

CDI-STE - Carcinoma ductal invasor sem tipo específico (ou sem outra especificação).

CI - Intervalo de confiança.

CGM - Célula gigante multinucleada.

CMF - Carcinoma mamário dos felinos.

CV - Coeficiente de variação.

DAB - Tetrahydrocloro de 3'3 diaminobenzidina.

EMMPRIN - “*Extracellular matrix metalloprotease inducitor*”.

FISH - Hibridação *in situ* por fluorescência.

H&E - Coloração de Hematoxilina - Eosina.

ID - Índice de ADN.

IHQ - Técnica de imuno-histoquímica.

Ki-67 - Proteína Ki-67.

n - Número de observações.

MEC - Matriz extracelular.

MB - Membrana basal.

MMPs - Metaloproteinases da matriz.

MT-MMP - Metaloproteinase da matriz de tipo membranas.

OMS - Organização Mundial de Saúde.

PAS – Método do Ácido periódico – Reagente de Schiff.

PBS - Tampão fosfato salino.

SLD - Sobrevida livre de doença.

ST - Sobrevida total.

SD - Desvio padrão (“*Standard deviation*”).

SPSS - “*Statistical Package for the Social Sciences*”.

TCSF - “*Tumor cell-derived collagenase stimulatory factor*”.

TIMP - Inibidor tecidual das metaloproteinases da matriz.

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular.

VEGFR - Receptor do Fator de crescimento endotelial vascular.

5cER - fracção de células com conteúdo de ADN superior a 5c (“*5c exceeding rate*”).

INTRODUÇÃO

As neoplasias da mama são as terceiras neoplasias mais frequentes nos felídeos domésticos, depois das neoplasias cutâneas e dos linfomas (Misdorp e Weijer, 1980; Theilen e Madewell, 1987; Castagnaro 1998a; Morrison, 1998; Misdorp *et al.*, 1999; Rutteman *et al.*, 2001; Misdorp, 2002; Tanabe *et al.*, 2002; Viste *et al.*, 2002). Representam 12% da totalidade das neoplasias dos felídeos e 17% das neoplasias das gatas (Rutteman *et al.*, 2001; Misdorp, 2002). Apresentam-se sob a forma de nódulos solitários ou múltiplos, do mesmo ou de diferentes tipos histológicos, afectando uma ou mais glândulas (Theilen e Madewell, 1987; Moulthon, 1990; Jones *et al.*, 1997; Misdorp, 2002).

Nos felídeos a frequência de neoplasias mamárias é menor que na cadela mas, a menor frequência é contrabalançada com uma maior agressividade biológica (Moulthon, 1990; Jones *et al.*, 1997). A relação entre as neoplasias malignas e benignas varia de 4:1 a 9:1., consoante as séries publicadas (Castagnaro 1998a, b; Rutteman *et al.*, 2001; Misdorp, 2002). As neoplasias benignas constituem apenas 15-20% das neoplasias de mama (Theilen e Madewell, 1987; Jones *et al.*, 1997).

Os carcinomas de mama da gata apresentam crescimento rápido e elevada tendência à recorrência e à metastização (Castagnaro 1998 a, b; Misdorp *et al.*, 1999), evidenciando um padrão metastásico similar ao da mulher (Preziosi *et al.*, 1995; Dincer *et al.*, 2001). O intervalo entre a detecção dos carcinomas e a morte varia entre 6 a 12 meses (Castagnaro 1998 a, b). Afectam usualmente gatas idosas, sendo raras nos machos (Theilen e Madewell, 1987; Moulthon, 1990; Jones *et al.*, 1997). A maioria das neoplasias (99%) ocorre em fêmeas não castradas (Misdorp *et al.*, 1991; Rutteman e Misdorp, 1993), mas a ovariectomia tem revelado um efeito protector, principalmente quando efectuada antes do primeiro ciclo éstrico (Jones *et al.*, 1997; Rutteman *et al.*, 2001; Overley *et al.*, 2005).

A génese das neoplasias mamárias é multifactorial (Misdorp, 2002; Szabo *et al.*, 2005) e envolve elementos da dieta e factores hormonais, de entre outros (Milanezi, 2005; Porrello *et al.*, 2006). A administração exógena e regular de progestagénios para inibição do estro tem também sido associada ao aumento significativo de neoplasias mamárias (Theilen e Madewell, 1987; Misdorp *et al.*, 1991; Rutteman e Misdorp, 1993; Misdorp, 2002) e de alterações fibroadenomas (Martín de las Mulas *et al.*, 2000; Loretto *et al.*, 2005), mesmo em gatos do sexo masculino (MacDougall, 2003). Contudo, a dependência dos carcinomas de mama da gata de hormonas esteróides parece pouco relevante (Moulthon, 1990) e os receptores de estrogénios, parâmetro com valor prognóstico no cancro de mama da mulher e

da cadela, na gata aparentemente apresentam uma expressão reduzida (Millanta *et al.*, 2005). Estes carcinomas podem ser considerados como modelo para o estudo de carcinomas hormono-independentes da mulher (Martín de las Mulas *et al.*, 2000a; Misdorp, 2002). Vários investigadores têm também referido a presença de partículas virais em carcinomas da mama da gata (Misdorp, 2002; Szabo *et al.*, 2005), em particular do vírus da Leucemia Felina (FeLV) (Morrison, 1998; Misdorp, 2002) e de vírus análogos ao vírus do tumor mamário dos murinos (MMTV “*Mouse mammary tumour virus*”) (Szabo *et al.*, 2005).

A classificação das lesões mamárias da Organização mundial de Saúde (OMS) para os felídeos baseia-se em critérios morfológicos (Misdorp *et al.*, 1999; Rutteman *et al.*, 2001; Misdorp, 2002). Os carcinomas da gata são considerados neoplasias monótonas, com baixa variabilidade histológica, inferior à observada na cadela, e portanto pouco explorados, o que se traduz claramente no baixo número de estudos publicados nesta espécie. Contudo, durante este estudo, observámos uma variabilidade morfológica e de tipos histológicos que nos surpreendeu e, constatámos que a classificação da OMS não se reflecte na realidade da prática de Anatomia Patológica para esta espécie animal. Parece-nos também que a classificação da OMS é elaborada tendo por base as neoplasias da cadela, tentando-se depois “encaixar” a mesma classificação noutra espécie animal, o que nem sempre pode ser efectuado; espécies diferentes apresentam aspectos fisiológicos distintos e desenvolvem processos patológicos diferenciados. E esta “ideia” parece confirmar-se quando verificamos que na referida classificação há 8 páginas a descrever as alterações/lesões da mama da cadela e apenas 3 relativas à mama da gata, sendo apresentados os mesmos tipos histológicos para as 2 espécies, com a excepção dos carcinomas complexos, fusiformes e anaplásicos apenas referenciados para a cadela e do carcinoma cribriforme apenas descrito na gata.

A classificação descritiva proposta pela OMS, é efectuada com base exclusivamente nos padrões arquitecturais, e o diagnóstico é obtido pela “combinação” dos vários padrões morfológicos, referenciando o predominante em primeiro lugar (Misdorp *et al.*, 1999); ora esta metodologia parece-nos desnecessariamente complexa, não permitindo encontrar um “critério unificador” na “miríade” de diagnósticos histológicos. Com tantas combinações possíveis é praticamente impossível encontrar significado prognóstico no tipo histológico, contrariamente à classificação da mama da cadela, onde existe a intervenção “supressora da invasão” das células mioepiteliais, que está bem descrita em múltiplos estudos (Sternlicht *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 2003; Adriance *et al.*, 2005), e que se traduz no melhor

comportamento biológico dos carcinomas de padrão bifásico, complexos e/ou mistos (Misdorp *et al.*, 1999).

Por acharmos que a classificação da OMS é desajustada à variabilidade histológica que observámos nestes últimos 6 anos, foi objectivo deste trabalho a elaboração de um sistema de classificação que melhor reflectisse os critérios histomorfológicos observados. Posteriormente, tentámos confirmar se a classificação elaborada se reflectia no comportamento biológico das lesões.

Apesar da escassez de estudos na gata, sabe-se que os factores de prognóstico do cancro de mama da mulher, gata e cadela são similares (Misdorp, 2002). O tamanho do tumor, o tipo e o grau histológico, a invasão vascular linfática/venosa, o envolvimento dos gânglios linfáticos regionais e os índices proliferativos, são considerados factores de prognóstico clássicos para o cancro de mama da mulher (van de Vijver, 2002; Ellis *et al.*, 2003; Milanezi, 2005) e, a maioria é também factor de prognóstico nos carcinomas de mama da cadela como foi demonstrado pelo estudo de Queiroga e Lopes (2002). Na gata foram já efectuados alguns estudos que sugerem que o tamanho, a extensão da cirurgia e o grau histológico têm implicações no prognóstico (Rutteman *et al.*, 2001). Porém como os estudos de seguimento são ainda poucos, são necessários novos trabalhos para pesquisar factores de prognóstico, histológicos clássicos e marcadores moleculares.

Estima-se que 40 a 60% dos carcinomas de mama da gata e da cadela apresentam micrometástases no momento da apresentação, que potencialmente podem causar a sua morte (Misdorp, 2002). Na mulher, está comprovado que uma percentagem de tumores se associa a comportamento biológico agressivo independentemente dos factores de prognóstico clássicos serem favoráveis. A identificação de doentes sem metástases regionais no momento do diagnóstico e/ou com micrometástases, associados a mau prognóstico, é uma preocupação constante e, quando os critérios clássicos não são suficientes, o recurso a marcadores moleculares é essencial (Milanezi, 2005). Na mulher há vários biomarcadores que fornecem informação de prognóstico; por exemplo a sobre-expresssão de HER-2, o p53, o VEGF e a ciclina E no tumor primário predizem o risco de doença metastática (Leppä *et al.*, 2004).

Na gata como os carcinomas evidenciam alta agressividade biológica, existe interesse acrescido na pesquisa de factores de prognóstico. Além dos estudos de cinética molecular estudámos factores que intervêm na invasão e na metastização, como moléculas de adesão celular, metaloproteinases da matriz e seus inibidores e o factor de crescimento endotelial

(VEGF), bem como de marcadores moleculares como o HER-2/*neu* e o conteúdo de ADN visando determinar a sua importância na oncobiologia dos carcinomas de mama da gata.

A invasão tumoral e a metastização são a principal causa de morbilidade e mortalidade em pacientes com cancro. No cancro de mama, o desenvolvimento de metástases é o factor de prognóstico mais importante, já que a maioria dos doentes com metástases à distância irão sucumbir da doença (Kowalski *et al.*, 2003). Vários estudos associaram a expressão aberrante de caderina E com o desenvolvimento de metástases em várias neoplasias malignas (Bukholm *et al.*, 1998) nomeadamente gástricas, da próstata, da mama (Kowalski *et al.*, 2003; Marques *et al.*, 2004; Charpin *et al.*, 2005), do pulmão (Yoshida *et al.*, 2001), da cérvix (Faleiro Rodrigues e Lopes 2004) e ovário (Yoshida *et al.*, 2001; Faleiro Rodrigues *et al.*, 2004). A caderina E (Gamallo *et al.*, 1993; Petersen *et al.*, 1998; Kowalski *et al.*, 2003; Faleiro Rodrigues *et al.*, 2004) e as cateninas (Faleiro Rodrigues *et al.*, 2004) têm sido reconhecidas como moduladoras do fenótipo celular normal e maligno. Todavia, é pouco provável que apenas as moléculas de adesão sejam responsáveis pela aquisição do fenótipo invasor (Restucci *et al.*, 1997), pelo que a avaliação de outros factores que intervêm na invasão pareceu-nos ser útil para a compreensão destes eventos.

Para invadir localmente as células neoplásicas têm que ter sucesso em 3 etapas: aderir, degradar e migrar na matriz extracelular (Benbow *et al.*, 1999; Kleiner e Stetler-Stevenson, 1999). Estes passos ocorrem contínua e simultaneamente à medida que as células migram pelos tecidos até atingir vasos, e finalmente quando saem das estruturas vasculares para estabelecer novos tumores (Brown, 1998). Devido a estas necessidades os níveis de metaloproteinases da matriz (MMPs) estão sobre-expressas em praticamente todos as neoplasias malignas (Nelson *et al.*, 2000; Hidalgo e Eckhardt, 2001; Coussens *et al.*, 2002), sendo particularmente altos na interface tumor-estroma (Sternlicht e Werb, 2001; Xu *et al.*, 2005).

As MMPs intervêm na biologia tumoral por vários mecanismos: 1) a acção proteolítica remove as barreiras físicas à invasão pela degradação das membranas basais e matriz extracelular (Sternlicht e Werb, 2001; Coussens *et al.*, 2002; Wolf *et al.*, 2003); 2) as MMPs têm capacidade de modular a adesão celular (Kleiner e Stetler-Stevenson, 1999; Vu e Werb, 2000; Fuchs *et al.*, 2005). As MMPs influenciam a actividade da caderina E (Sternlicht e Werb, 2001; Fuchs *et al.*, 2005) promovendo a invasão e alteram a ligação das células à matriz destruindo os receptores integrínicos (Sternlicht e Werb, 2001); 3) direccionam a

migração celular (Giannelli *et al.*, 1997; Fata *et al.*, 2004), 4) podem promover o crescimento e invasão tumoral ao libertar factores de crescimento (DeClerck *et al.*, 2004; Miyata *et al.*, 2004; Sottile, 2004) e factores angiogénicos como o VEGF, sequestrados na matriz extracelular (Chambers e Matrisilian, 1997; Sternlicht e Werb, 2001), podem libertar factores de crescimento e expor receptores presentes na membrana celular (Chang e Werb, 2001; Visse e Nagase, 2003) ou gerar fragmentos com actividade biológica (Loo *et al.*, 2004; Sottile, 2004). Intervêm assim em múltiplos passos da progressão e aquisição do fenótipo maligno, da invasão, angiogénese tumoral e metastização à distância (Coussens *et al.*, 2002).

A função da angiogénese na biologia do cancro foi proposta por Folkman (citado por Brown *et al.*, 1995 e Nicollini *et al.*, 2004) que, em 1971 postulou que os tumores sólidos com 2-3 mm permaneciam em estado de latência na ausência de neovascularização. Posteriormente vários estudos confirmaram que o crescimento tumoral é dependente da angiogénese e que esta está implicada na progressão das lesões pré-malignas a neoplasias malignas, na disseminação das células neoplásicas e no crescimento das micrometástases a metástases extensas (Nicollini *et al.*, 2004); está assim implicada desde as primeiras fases da cancerização até às fases mais avançadas da metastização à distância (Kawai *et al.*, 2002; Vajkoczy *et al.*, 2002; Nicollini *et al.*, 2004). O factor de crescimento endotelial (VEGF) é o factor angiogénico mais estudado em oncologia humana (Gasparini, 2000; Tse *et al.*, 2004; Valente *et al.*, 2006). Vários estudos referiram que o VEGF e os seus receptores estão sobre-expressos nos tumores (De Jong *et al.*, 1998; Adams *et al.*, 2000; Nakopoulou *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2003). No cancro de mama da mulher a expressão de VEGF tem sido correlacionada com o aumento da vascularização (Gasparini *et al.*, 1997; Gunningham *et al.*, 2000; Wen *et al.*, 2002; Chhieng *et al.*, 2003; Lincoln II *et al.*, 2003; Turashvili *et al.*, 2005), com a recidiva (Milanta *et al.*, 2002), o envolvimento ganglionar e o prognóstico (Linderholm *et al.*, 1998; Garvin e Dabrosin, 2003; Nakamura *et al.*, 2003; Nicolini *et al.*, 2004), mas em Medicina Veterinária o estudo do VEGF está ainda numa fase incipiente e, na bibliografia consultada, apenas encontramos o estudo de Millanta *et al.* (2002b) na mama da gata.

O HER-2/*neu* é um receptor membranar da família do receptor do factor de crescimento epidérmico (EGFR) (Medi *et al.*, 1995; Roetger *et al.*, 1998; Masood e Bui, 2002; Ross *et al.*, 2003; Dahlberg *et al.*, 2004). A sobre-expressão deste receptor está associada a progressão tumoral, comportamento biológico mais agressivo e menores tempos de sobrevivência em

várias neoplasias do Homem nomeadamente no cancro de mama (Roetger *et al.*, 1998; Ménard *et al.*, 2000; Pauletti *et al.*, 2000; Konecny *et al.*, 2004; Milanezi, 2005), do ovário, endométrio, bexiga, glândula salivar, estômago e pulmão (Milanezi, 2005). Além do seu valor prognóstico, o HER-2/*neu* tem valor preditivo da resposta a determinados agentes terapêuticos (Martín de las Mulas *et al.*, 2003; De Maria *et al.*, 2005; Milanezi, 2005). A sua importância no cancro de mama da mulher advém da utilização de inibidores contra este receptor em doentes com cancro de mama metastático, permitindo uma melhoria significativa da sobrevivência (Jacobs *et al.*, 1999; Milanezi, 2005).

Os estudos destas moléculas em Medicina Veterinária são ainda escassos; todavia estes permitem não só conhecer as inter-relações estreitas que existem entre estas moléculas que intervêm na aquisição do fenótipo invasor e metastático, bem como permitem o recurso a terapias moleculares específicas direccionadas contra receptores com actividade tirosina cínase (HER-2/*neu*), factores de crescimento tumoral (Milanezi, 2005) e MMPs (Brown, 1998; Hidalgo e Eckhardt, 2001; Sternlicht e Werb, 2001; Wolf *et al.*, 2003), que já são utilizadas na mama da mulher e potencialmente podem ser utilizadas nos carcinomas da gata permitindo diminuir a sua agressividade biológica. Com este trabalho além de um estudo de frequência e da caracterização morfológica das lesões mamárias da gata, pretendemos contribuir para a compreensão dos mecanismos biológicos subjacentes à aquisição da invasão e metastização.

OBJETIVOS

Foi objectivo deste trabalho o estudo da frequência dos vários tipos de alterações não neoplásicas e de neoplasias mamárias, bem como a pesquisa de critérios clinico-patológicos de agressividade biológica. Assim, pretendemos responder às seguintes questões:

- * Vale a pena classificar as neoplasias?
- * Têm os padrões morfológicos importância no comportamento biológico?
- * Vale a pena graduar os carcinomas? Os diferentes graus histológicos têm implicação no comportamento biológico e história natural dos carcinomas?
- * As alterações e lesões mamárias adjacentes aos carcinomas e as alterações mamárias não neoplásicas “solitárias” são passos evolutivos do processo de cancerização ou não têm qualquer significado biopatológico?

Foram ainda objectivos:

- * A pesquisa de biomarcadores moleculares do cancro de mama associados à invasão e à metastização, nomeadamente moléculas de adesão celular (Caderina E e β -catenina), proteases estromais (MMP1 e MMP2) e seus inibidores (TIMP1), e factores angiogénicos (factor de crescimento endotelial - VEGF).
- * A determinação do conteúdo de ADN nuclear das células neoplásicas e sua relação com critérios clinico-patológicos clássicos.
- * O estudo de seguimento e pesquisa de factores de prognóstico.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

Foram estudadas 128 nódulos mamários de felinos domésticos recebidos no Laboratório de Histologia e Anatomia Patológica da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (LHAP-UTAD) durante os anos de 2001 e 2002. O material era proveniente de várias clínicas e hospitais veterinários da região norte e centro do país e do Hospital Veterinário da UTAD. Este estudo incidiu sobre alterações/lesões primárias e espontâneas originárias de 115 felídeos domésticos, obtidas por nodulectomia, mastectomia parcial ou radical.

O material foi recebido no laboratório já fixado em formol a 10%, com tempo de fixação variável, incluído em parafina e processado segundo o procedimento de rotina para microscopia de luz. Dos blocos de parafina seleccionados foram efectuados vários cortes para estudos histopatológicos, técnicas de histoquímica e imuno-histoquímica e análise do conteúdo de ADN.

ESTUDO DAS VARIÁVEIS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

AVALIAÇÃO CLÍNICA

Foram recolhidos dados clínicos relativos ao animal, nomeadamente a raça, o sexo, a idade, o estado reprodutivo (inteira vs ovariectomizada), o uso de contraceptivos, o número de lesões mamárias, a sua localização, tamanho, ulceração e início do processo lesional.

O tamanho das lesões apresentadas neste estudo refere-se ao seu diâmetro maior. Para o tratamento estatístico esta variável foi categorizada em 3 grupos (inferior a 2 cm; de 2 a 3 cm e superior a 3 cm) de acordo a classificação TNM para as neoplasias mamárias felinas.

Para estratificar a população para a análise da idade utilizou-se o seguinte “cut-off”: <8 anos; 8-11 anos; >11 anos, sendo o limite inferior do intervalo a média das idades das lesões benignas e o limite superior a média de idades das neoplasias malignas.

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Todas as preparações histológicas foram revistas e reclassificadas. O diagnóstico e classificação foram efectuados por dois observadores independentes, utilizando os mesmos critérios, de modo a assegurar a consistência no diagnóstico. As lesões foram classificadas

com base nas características histológicas predominantes. Se um animal evidenciava lesões múltiplas, ou apresentava tumor primário e metástases, estas também eram incluídas no estudo. Foram seleccionados blocos representativos das lesões e sempre que possível, com representação de glândula mamária não neoplásica.

As lesões foram classificadas num ensaio cego de acordo com as suas características citológicas e comportamento biológico em alterações não neoplásicas, neoplasias benignas e malignas, tendo sido avaliados os parâmetros descritos no quadro 1.

Quadro 1. Parâmetros avaliados no exame de microscopia de luz dos nódulos mamários.

Tipo de crescimento	Infiltrativo (1) Expansivo (2)
Necrose	Ausente (0) Necrose de células isoladas (1) Extensas áreas de necrose tumoral (2)
Diferenciação epidermóide, apócrina e/ou mucossecretora	Ausente vs presente
Invasão	Ausente (0) Invasão do estroma (1) Invasão do músculo esquelético (2)
Permeação vascular	Ausente vs presente
Metastização	Ausente vs presente
Estroma neoplásico	Escasso(0) Moderado(1) Abundante(2)
Infiltrado inflamatório - Abundância	Escasso(0) Moderado(1) Abundante(2)
- Tipo celular predominante	Polimorfonuclear, linfóide, histiocitário ou misto
Presença de células gigantes multinucleadas (CGM)	Tipo osteoclasto Tipo tumoral

- **Avaliação do índice mitótico:** A contagem de mitoses foi efectuada nas áreas neoplásicas e não neoplásicas que apresentavam maior actividade proliferativa. O índice mitótico foi obtido pela contagem do número total de mitoses observadas em 1000 células, usando uma objectiva de grande ampliação (40x) e ocular com retículo (Zeiss®).

- Foi também efectuada o estudo das lesões presentes na mama adjacente aos carcinomas: alteração fibroquística (AFQ) e carcinoma “in situ” (CDIS).

As *neoplasias malignas* foram ainda classificadas de acordo com o seu padrão morfológico, diferenciação celular e estadio:

- Padrão morfológico

Para a avaliação do padrão morfológico foram avaliados percentualmente todos os padrões arquiteturais presentes. Considerou-se que um carcinoma era de um determinado padrão morfológico quando esse padrão estava presente em pelo menos 50% da massa neoplásica total; quando nenhum padrão morfológico atingia 50% da massa neoplásica, o carcinoma era classificado de tipo morfológico misto.

- Tipo histológico

Os carcinomas foram classificados de acordo com a sua diferenciação celular em 4 tipos:

- ***Carcinoma epitelial-mioepitelial (CEM)***: carcinoma de padrão bifásico, caracterizado por proliferação de células epiteliais e mioepiteliais neoplásicas, sem estarem contudo associadas a focos de metaplasia conjuntiva.
- ***Carcinoma metaplásico***: os carcinomas que apresentavam áreas metaplásicas superiores a 10% da massa neoplásica total. Aqui se incluíram todos os carcinomas com extensas áreas de proliferação de células fusiformes (carcinoma de células fusiformes), carcinomas com áreas de carcinoma epidermóide e os carcinomas metaplásicos mistos caracterizados pela presença de elementos heterólogos com formação de cartilagem de tipo mesenquimatoso ou bem diferenciada e/ou tecido ósseo.
- ***Carcinoma micropapilar invasor***: carcinomas ductais com predomínio de padrão micropapilar (igual ou superior a 50% da massa neoplásica total).
- ***Carcinoma ductal invasor sem tipo específico (CDI-STE)***: grupo constituído pelos carcinomas com diferenciação ductal mas que não apresentavam características histológicas particulares para serem incluído nos tipos específicos anteriores, ou seja, inclui neoplasias que independentemente do seu padrão morfológico não apresentavam população mioepitelial abundante ou evidenciavam áreas metaplásicas inferiores a 10% da massa neoplásica total. Também se incluíram neste grupo carcinomas com áreas micropapilares inferiores a 50% da massa neoplásica.

- Grau histológico

O grau histológico das neoplasias malignas foi avaliado de acordo com o Método de Nottingham, modificado por Elston e Ellis (1998), que avalia a formação de túbulos, o pleomorfismo nuclear (**grau nuclear**) e o número de mitoses. É um método semi-quantitativo que utiliza um sistema numérico de 1-3 para avaliar cada item em separado, que quando adicionado permite estratificar os carcinomas em bem diferenciados (grau I), moderadamente diferenciados (grau II) ou pouco diferenciados (grau III). No anexo I encontram-se informações pormenorizadas acerca deste sistema de classificação.

Apesar de habitualmente a classificação em graus histológicos não se aplicar aos CEM, neste estudo foi aplicada a todos os carcinomas de modo a estratificá-los em grupos com diferentes comportamentos biológicos e prognóstico.

Dada a importância habitualmente associada ao grau de pleomorfismo nuclear (**grau nuclear**), este parâmetro foi também analisado separadamente.

- Estadio

Para o estadiamento dos carcinomas usámos o sistema TNM da OMS modificado para ser aplicado nos carcinomas felinos (Withrow e MacEwen, 2000; Rutteman *et al.*, 2001) que se baseia nos seguintes critérios: (1) Tamanho do tumor primário (T); 2) envolvimento dos gânglios linfáticos regionais (N) confirmado por citologia ou histologia e 3) ocorrência de metástases à distância (M) (Quadro 2). O T corresponde ao diâmetro maior do nódulo mamário, sendo T₁ tumores com dimensões inferiores a 2 cm, T₂ entre 2 e 3 cm e T₃, com dimensão superior a 3 cm. Relativamente ao estado ganglionar N₀ corresponde a ausência de metástases ganglionares e N₁ à sua presença; sempre que não foi referido nas informações clínicas e/ou quando não foram enviados os gânglios regionais, considerámos que as gatas eram N₀. O M₀ corresponde a ausência de metástases à distância e M₁ à sua ocorrência.

Quadro 2. Estadio TNM.

Estadio	T	N	M
I	T ₁	N ₀	M ₀
II	T ₂	N ₀	M ₀
III	T _{1,2}	N ₁	M ₀
	T ₃	N _{0,1}	M ₀
IV	qualquer T	qualquer N	M ₁

Colorações e métodos histoquímicos

Para confirmar a presença de secreção mucossecretora, o tipo de mucopolissacarídeos produzidos e a ocorrência de alterações na composição da matriz conjuntiva do estroma neoplásico foram efectuadas as colorações e métodos histoquímicos de PAS-Azul de Alcian a pH 1.0, e PAS com tratamento de diastase a 1%, efectuados de acordo com a técnica laboratorial de rotina.

Estudos de Imuno-histoquímica

Para este estudo utilizámos vários anticorpos para avaliar a imuno-expressão de proteínas do citoesqueleto, moléculas de adesão celular, antigénios associados ao ciclo celular (Ki-67) e a genes (HER-2/*neu*).

Os anticorpos foram testados em tecido felino para confirmar a sua aplicação na espécie, optimizar a diluição mais adequada, averiguar a necessidade de realizar tratamento térmico e/ou proteolítico para incrementar a imuno-expressão. Todos os estudos foram realizados segundo o método indirecto da Estreptavidina-Biotina-Peroxidase (ABC).

Depois da desparafinação e hidratação, os cortes histológicos foram submetidos a tratamentos para recuperação antigénica. As preparações foram incubadas com soro normal de coelho (X0902, Dako[®]) no caso dos anticorpos monoclonais, ou soro de porco (X0901, Dako[®]) para os anticorpos policlonais. Posteriormente foram incubadas com o soro primário, à temperatura, tempo e diluições especificadas no quadro 3. Seguidamente as preparações foram incubadas com o complexo Estreptavidina-Biotina-Peroxidase (TS-125-HR, Labvision[®]). A reacção da peroxidase foi visualizada usando como cromogénio o Tetrahidroclorato de 3'3 Diaminobenzidina (DAB) (Novocastra[®], NCL-DAB); posteriormente as preparações foram contrastadas com Hematoxilina de Gill, diafanizadas e montadas com Entellan[®] (Merk[®]).

Foram utilizados controlos negativos, nos quais foi substituído o anticorpo primário por tampão PBS e, como controlos positivos, casos em que a imunoreactividade para os antigénios estudados tinha sido demonstrada previamente.

Quadro 3. Anticorpos primários e procedimentos informativos.

Anticorpo	Clone/Origem	Diluição	Recuperação antigénica e tempo de incubação
Vimentina	NCL-Vim-Va, Dako	1:100	10 minutos MO em tampão citrato. Incubação 60 minutos TA.
Panqueratina	Z0622, Dako	1:1000	10 minutos MO em tampão citrato. Incubação 60 minutos TA
Citoqueratina 14	NCL-LL 002, Novocastra	1:20	10 minutos MO em tampão citrato. Incubação 60 minutos TA
P63	4A4, Neomarkers	1:150	15 minutos MO em tampão citrato. Incubação ON a 4°C.
Calponina	CALP, Dako	1:400	15 minutos MO em tampão citrato. Incubação ON a 4°C.
Ki-67	Mib1, Dako	1:100	15 minutos MO em tampão citrato. Incubação ON a 4°C.
Caderina E	CAT-5H10, Zymed	1:200	15 minutos MO em solução aquosa de Extran 0.05%. Incubação ON a 4°C.
β-Catenina	4 A2 C7, Zymed	1:200	15 minutos MO em solução aquosa de Extran 0.05%. Incubação ON a 4°C.
VEGF	JH121, Neomarkers	1:150	15 minutos MO em tampão citrato. Incubação ON a 4°C.
MMP-1	Neomarkers	1:100	15 minutos MO em tampão citrato. Incubação ON a 4°C.
MMP-2	Neomarkers	1:150	15 minutos MO em tampão citrato. Incubação ON a 4°C.
TIMP-1	Neomarkers	1:150	15 minutos MO em tampão citrato. Incubação ON a 4°C.
RE LH2	CC4-5, Novocastra	1:20	Panela pressão em tampão citrato Incubação ON a 4°C, 18°C e 26 °C.
RE	Clone 6F11, Novocastra	1:20	Panela pressão em tampão citrato Incubação ON a 4°C, 18°C e 26 °C.
RP	Clone 1A6, Novocastra	1:20	Panela pressão em tampão citrato Incubação ON a 4°C, 18°C e 26 °C.
RP	Clone SP2, Neomarkers	1:20	Panela pressão em tampão citrato Incubação ON a 4°C, 18°C e 26 °C.
HER-2/neu	c-erbB2; Dako	1:50	15 minutos MO em tampão citrato. Incubação ON.

(MO: tratamento térmico em microondas; ON: incubação durante a noite; TA: incubação à temperatura ambiente; Ki-67: Antígeno Ki-67; VEGF: factor de crescimento endotelial; MMP: metaloproteínase da matriz, TIMP: inibidor tecidual das metaloproteínas da matriz)

Métodos de quantificação da imunoreactividade

Antígeno Ki-67

A imuno-expressão foi considerada positiva quando ocorria no núcleo, independentemente da intensidade de marcação. A quantificação da marcação foi realizada pela contagem dos núcleos imunomarcados em 1000 células neoplásicas, identificadas por critérios morfológicos, em 5 a 10 campos de grande ampliação, de acordo com estudos

prévios (Castagnaro 1998 b; Preziosi *et al.*, 2002; Dias Pereira *et al.*, 2004). Foram seleccionadas para contagem as áreas neoplásicas que revelavam maior imunorreactividade, tendo sido contabilizados os núcleos homogeneamente marcados, ou nas células eucromáticas, com marcação do nucléolo e envelope nuclear. A contagem foi realizada sempre pelo mesmo observador, usando uma ocular com retículo (Zeiss®). Os valores obtidos foram expressos pela relação entre as células marcadas e o número total de células contabilizadas, obtendo-se uma relação percentual considerada como índice de proliferação.

Foi também avaliado o índice de Ki-67 no tecido mamário não neoplásico adjacente às neoplasias e no carcinoma “in situ” segundo o procedimento acima referido.

Vimentina e Citoqueratina 14 (CK14)

A expressão destas duas proteínas foi considerada positiva sempre que a marcação ocorria no citoplasma das células epiteliais e mioepiteliais neoplásicas e mama não neoplásica adjacente. Foi avaliada de forma semi-quantitativa de acordo com o referido no quadro 4. O marcador “Vimentina” permitiu ainda avaliar a preservação antigénica do material em estudo.

Quadro 4. Avaliação da imunomarcação para os anticorpos Vimentina e CK14.

Categoria	% de células positivas
-	<5%
+ (focal)	5-25%
++ (multifocal)	25-50%
+++ (difusa)	>50%

P63 e Calponina

A expressão da proteína p63 foi avaliada no núcleo das células basais/mioepiteliais como ausente (-), presente e difusa (+) ou inconstante (+/-). A expressão de calponina foi analisada no citoplasma das células mioepiteliais, epitélio luminal, miofibroblastos estromais e miócitos como ausente (-) e presente (+).

Caderina E e β -Catenina

A expressão destas proteínas foi avaliada no tecido não neoplásico e neoplásico de acordo com os seguintes parâmetros:

- Extensão da imunomarcação - a percentagem de células epiteliais positivas foi avaliada de forma semi-quantitativa em menos de 25% (focal), de 25 a 75% (regional) e mais de 75% (difusa), de acordo com trabalhos prévios (Brunetti *et al.*, 2003; Sarli *et al.*, 2005). A

imunomarcação superior a 75% foi classificada como preservada, e as restantes como diminuída.

- Padrão de marcação - presença de marcação típica (membranar) ou aberrante (citoplasmática e/ou nuclear), de intensidade homogénea *versus* heterogénea.

MMP1, MMP2 e TIMP1

A expressão das metaloproteinases da matriz MMP1 e MMP2 foi avaliada de forma semi-quantitativa usando o sistema de avaliação descrito por Kallakury *et al.*, (2001) e Miyata *et al.* (2004) e que tem por base a extensão e a intensidade de imunomarcação. A extensão da marcação foi avaliada como focal (igual ou inferior a 10%), regional (entre 11 e 50%) e difusa (superior a 50%) e a intensidade como fraca, moderada ou intensa. Os padrões de marcação de moderado e difuso, intenso e regional, ou intenso e difuso foram considerados positivos, ou seja com sobre-expressão.

VEGF

A avaliação deste marcador foi efectuada de acordo com o descrito por Nicolini *et al.* (2004) no cancro de mama da mulher. A expressão foi avaliada quanto à extensão e intensidade de marcação quer nas neoplasias quer no tecido não neoplásico. Relativamente à extensão foi avaliada em 1 (<25% das células marcadas), 2 (26-50%) e 3 (> 51% de células marcadas). A intensidade foi categorizada como fraca (1), moderada (2) e intensa (3). Da combinação destes 2 parâmetros surge o *score* final ≤ 3 (lesões com baixo índice de imunorreactividade) e > 3 (lesões com expressão alta de VEGF).

HER-2/neu

Para análise do HER-2/*neu* (também denominado *neu*, c-erbB2, HER-2) foi utilizado o sistema de graduação standard utilizado em Medicina Humana, recomendado pelo Colégio Americano de Patologistas e pelo Programa Nacional de Avaliação de Qualidade Externa do Reino Unido. Este sistema resulta de um *score* entre a intensidade e a extensão da coloração, que é referido no quadro 5. Só os carcinomas graduados como (2+) ou (3+) são considerados positivos (Milanezi, 2005; Ribeiro-Silva *et al.*, 2005). Para uniformizar a nomenclatura usaremos o termo HER-2 ou HER-2/*neu*.

Quadro 5. Graduação da imuno-expressão de HER-2/*neu*.

Positividade HER-2/ <i>neu</i>	Graduação	Resultado
- Positividade citoplasmática - Positividade membranar inferior a 10% das células neoplásicas	0	Negativo
- Positividade membranar incompleta de fraca intensidade em mais de 10% das células neoplásicas	1+	Negativo
- Positividade membranar completa de intensidade moderada em mais de 10% das células neoplásicas	2+	Positivo
- Positividade membranar completa de intensidade forte em mais de 10% das células neoplásicas	3+	Positivo

ANÁLISE DO CONTEÚDO DE ADN POR CITOMETRIA DE IMAGEM

Procedimento

Foram efectuados cortes de 6 µm dos carcinomas mamários em estudo (n=94), do mesmo bloco de parafina utilizado para os estudos histopatológicos. As preparações histológicas, foram coradas pelo método de Feulgen usando o *kit* de coloração “CAS DNA” (Becton Dickinson®, Cell Analysis Systems, Elmhurst, III). O procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Em todos os banhos de coloração foi utilizada uma lâmina de hepatócitos de rato, fornecida pelo fabricante do Kit, para a calibração do aparelho e controlo externo da coloração (Cajulis *et al.*, 1995; Reeder *et al.*, 1997; Oliveira, 2005).

Após a desparafinação e hidratação, as preparações histológicas e lâmina de calibração foram submetidas a hidrólise com Ácido Clorídrico 5N (Merck®), durante 60 minutos. Em seguida as preparações histológicas foram imersas na solução de coloração durante 60 minutos, após os quais, foram sujeitas a banhos sequenciais com a “solução de lavagem” durante 30 segundos, 5 minutos e, por último 10 minutos. Após serem diferenciadas em álcool ácido a 1%, as lâminas foram desidratadas, diafanizadas e montadas com Entellan (Merk®).

Quantificação do conteúdo de ADN nuclear

A quantificação e interpretação dos resultados foi efectuada no sistema de análise de imagem CAS 200® (Cell Analysis Systems, Inc., Elmhurst, III) através do programa “Quantitative DNA Analysis 3.0”.

O citómetro de imagem foi calibrado com a lâmina de hepatócitos de rato, com um conteúdo de ADN conhecido (Cohen *et al.*, 1991). Após a calibração procedeu-se à análise

das preparações histológicas. Em cada caso foi analisado o valor médio de ADN de pelo menos trinta linfócitos presentes no estroma tumoral; estas células de referência foram usadas como controlo interno da ploidia de ADN, definindo o conteúdo de ADN diplóide (2c) para a espécie em estudo (Auer *et al.*, 1980; Santos *et al.*, 2003).

A análise do conteúdo de ADN foi realizada pela leitura de pelo menos 100 núcleos bem preservados, evitando-se os núcleos sobrepostos, destruídos ou na margem do campo de leitura (Cajulis *et al.*, 1995; Reeder *et al.*, 1997; Oliveira, 2005). Os resultados, obtidos sob a forma de histogramas de ADN, representam a distribuição da população celular de acordo com a intensidade de coloração do ADN. Na análise de cada um dos histogramas foi identificado o pico G₀/G₁ e calculado o índice de ADN (ID), o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV). O CV das células de referência, foi utilizado como controlo de qualidade dos estudos citométricos realizados (Sampedro e Orfao, 1993; Pires *et al.*, 2001).

As populações celulares podem mostrar diferentes conteúdos de ADN e o grau de variação deste relativamente às células normais é expresso como Índice de ADN (ID), parâmetro determinado pela razão entre o conteúdo de ADN do pico G₀/G₁ da população em estudo e o valor médio do pico G₀/G₁ da população de referência (diplóide) (Sampedro e Orfao, 1993; Reeder *et al.*, 1997; Roels *et al.*, 1998; Tachibana *et al.*, 1999).

A região de ADN diplóide foi definida como o conteúdo de ADN compreendido entre o valor médio do ID da população de referência ± 3 desvios padrões (1 ± 0.17). Todos os carcinomas cujo ID do pico G₀/G₁ apresentava valores compreendidos na região diplóide foram classificados como diplóides de ADN; todos os que possuíam ID fora desta região foram classificados como aneuplóides de ADN. Todos os carcinomas aneuplóides com histogramas com 2 ou mais picos G₀/G₁ foram classificados como multiplóides de ADN.

Foram ainda avaliadas as percentagens de células com conteúdo de ADN superior a 5c (5cER). A fracção 5c foi categorizada em ausente (5cER=0), inferior a 1% (5cER<1%) e superior a 1% (5cER>1%).

ESTUDO DE SOBREVIVÊNCIA

Os animais foram submetidos a um estudo de seguimento por um período mínimo de 24 meses. Estas informações obtidas através do clínico assistente e/ou por contacto telefónico com o proprietário, incidiu sobre o período de sobrevivência livre de doença (SLD) e o período de sobrevivência global (ST). O tratamento estatístico destas variáveis só foi

efectuado nos carcinomas. Nas gatas com carcinomas múltiplos foi seleccionada para análise a lesão com características histológicas de maior agressividade biológica (de grau de malignidade mais elevado, e em casos de desempate o estadio).

Considerou-se como período de *sobrevivência livre de doença* (SLD) o período de tempo (meses) que decorreu desde a exérese cirúrgica e o aparecimento de recidiva local e/ou sintomatologia clínica de metastização ou morte sem doença oncológica.

O tempo de *sobrevivência total* (ST) foi definido como o intervalo de tempo que decorreu desde a data do tratamento cirúrgico e a morte ou eutanásia por cancro, ou da data da última observação, até 31 de Dezembro de 2004.

Para averiguar o efeito dos índices de proliferação celular na sobrevivência, os carcinomas foram categorizados, em função do valor da sua mediana, em pouco proliferativos (índice menor ou igual ao valor da mediana) e muito proliferativos (índice maior ou igual ao valor da mediana).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em frequências absolutas e relativas. Para comparar variáveis categóricas usou-se o teste de Qui-quadrado e o teste exacto de Fisher (two-sided). As variáveis numéricas foram estudadas com aplicação do teste Anova, Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney.

Para determinar o efeito das diferentes variáveis no prognóstico foi efectuada a análise de sobrevivência usando o método de Kaplan-Meier. Para a análise da sobrevivência as variáveis dependentes de interesse foram a sobrevivência total (ST) e a sobrevivência livre de doença (SLD). A comparação estatística entre curvas foi efectuada segundo o teste de Log-rank e, quando adequado, pelo teste Breslow. Para determinar a forma como a sobrevivência é afectada pelas outras co-variáveis e quais as variáveis com efeito prognóstico independente foi efectuada a análise multivariada através do método de regressão de Cox. O risco relativo foi estimado usando o intervalo de confiança de 95%.

O nível de significância admitido foi de $p < 0,05$. Para a realização da análise estatística foi utilizado o programa SPSS 11.5.

RESULTADOS

Foram avaliados 130 nódulos mamários obtidos em 117 felídeos do sexo feminino, cujas frequências absolutas e relativas se encontram discriminadas no quadro 6. A maioria eram carcinomas (n=94; 72 %), correspondendo as neoplasias benignas a apenas 10% do total da série (n=13), e as alterações não neoplásicas a 18% (n=23). Foi possível obter informação acerca do período de tempo que decorreu desde a sua detecção e a excisão cirúrgica em 38 gatas. Em 74% dos casos (n=28), o tempo referido pelo foi igual ou inferior a 6 meses.

Quadro 6. Classificação histológica das alterações mamárias analisadas.

Tipo histológico	n (%)
Alterações proliferativas não neoplásicas	
Alteração fibroquística (AFQ)	6 (4,6)
Alteração fibroadenomatosa total (AFT)	17 (13,1)
Neoplasias benignas	
Adenoma tubular	3 (2,3)
Adenoma epitelial-mioepitelial (adenoma complexo)	2 (1,5)
Papiloma invertido	1 (0,8)
Fibroadenoma	7 (5,4)
Neoplasias malignas	
Carcinoma papilar não invasor ("in situ")	1 (0,8)
Carcinoma ductal invasor sem tipo específico (CDI-STE)	65 (50,0)
Carcinoma epitelial-mioepitelial (CEM)	8 (6,2)
Carcinoma metaplásico	12 (9,2)
Carcinoma micropapilar invasor	8 (6,2)
Total	130 (100,0)

I. CARACTERIZAÇÃO CLÍNICO-PATOLÓGICA

Raça e idade

A maioria das alterações mamárias surgiu em gatas de raça Europeu Comum (n=83; 64%), seguida da raça Siamesa (n=38; 29%) e animais cruzados (5 cruzados de siamês e 1 de Persa) (5%). A raça menos frequentemente observada foi a Persa (n=3; 2%).

Foi possível obter informação acerca da idade de 108 gatas; esta variou entre os 5 meses e os 19 anos (média 10 anos).

Número, localização e dimensões

Obtivemos informação sobre o número de nódulos mamários em 119 casos. Na maioria dos casos (n=82; 70%) eram massas múltiplas, afectando entre 2 (n=78) a 5 mamas (n=1) de

uma ou ambas as cadeias mamárias (fig. 1). As lesões múltiplas corresponderam principalmente a carcinomas (69/82). Em 77 casos obtivemos informação relativa à cadeia mamária afectada e relativa à localização (mamas craneais *versus* caudais) em 87. As alterações surgiram com maior frequência na cadeia mamária esquerda (n=42; 55%) e nas mamas caudais (abdominais e inguinais; n=43, 49%). Quando foi especificada a glândula afectada, a mama número quatro ou inguinal foi a mais frequentemente referida e, a menos afectada foi a axilar (número um).

A dimensão média das alterações mamárias analisadas foi de 2,9 cm (mínimo 0,3 cm - máximo 18 cm). A maior massa observada, com o peso de 1,5 Kg, era uma alteração fibroadenomatosa total (AFT) excisada de uma gata de 3 anos.

Contracepção

Só foi possível obter esta informação em 69 gatas (correspondente a 77 dos casos avaliados). As gatas submetidas a tratamento hormonal apresentaram maiores frequências de alterações e lesões mamárias relativamente às gatas não tratadas, com envolvimento frequente de várias glândulas em simultâneo. Contudo, a contracepção não apresentou associação estatística com nenhum dos parâmetros clínico-patológicos analisados.

Ulceração cutânea

A ulceração foi observada apenas em 24% (n=31) das massas mamárias e surgiu principalmente associada aos carcinomas (fig. 2).

II. CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA

A lesão mais frequentemente observada foi o carcinoma, razão pela qual vamos centrar o nosso estudo neste tipo histológico.

1. CARCINOMAS FELINOS

Os carcinomas caracterizaram-se por aspectos morfológicos muito diversos, quer do ponto de vista macro quer microscópico. As raças mais representadas foram a Europeu Comum (56%; n=53) e a Siamesa (36%; n=34) e a idade variou entre 4 e 19 anos (média de 11 anos), com apenas 11% (n=10) dos casos com idade inferior a 8 anos. A maioria das lesões foi detectada pelos proprietários em média 6 meses antes da cirurgia, sendo

usualmente o motivo da cirurgia o crescimento rápido da massa neoplásica e/ou a sua ulceração. A maioria das lesões era múltipla (79%; n=69), afectando uma ou ambas as cadeias mamárias.

Apesar da cirurgia ter sido efectuada com intenção curativa, 73% das lesões (n=69) rasavam os bordos de excisão, e 21% (n=20) não se encontravam contidas nas margens da exérese. Na altura da exérese, 22 carcinomas (23%) apresentavam metástases nos gânglios linfáticos regionais, mas, só em dois casos os clínicos assistentes referiram a existência de metástases pulmonares. Pelo menos 35 gatas (37%) desenvolveram posteriormente metástases, como foi confirmado radiograficamente e/ou no exame de necrópsia. Os órgãos mais frequentemente afectados foram os gânglios linfáticos e o pulmão (fig. 3 e 4), mas também foram observadas metástases no rim (fig. 5), no útero e ovário, no pâncreas, no fígado, na glândula adrenal, no cérebro (fig. 6) e no olho.

ASPECTO MACROSCÓPICO

À observação macroscópica os carcinomas eram nódulos sólidos, solitários ou múltiplos, por vezes ulcerados, constituídos por tecidos firmes, de coloração esbranquiçada, com extensas áreas de necrose. Alguns apresentavam cavidades quísticas contendo fluído seroso ou gelatinoso, translúcido a acastanhado (fig. 7). Muitos apresentavam limites arredondados, circunscritos mas não capsulados, sendo contudo óbvia e frequente a compressão e/ou invasão do músculo adjacente.

PARÂMETROS MICROSCÓPICOS

Padrões arquitecturais

A maioria dos carcinomas apresentou vários padrões morfológicos (variando de 2 a 5), sendo raras as formas puras, ou seja, com apenas um padrão arquitectural. Em 45% das lesões (n=42) predominou o padrão sólido mas, em 33% (n=31) dos casos, nenhum padrão atingiu 50% da massa neoplásica, sendo classificados como lesões de morfologia mista (2º padrão mais comum).

O padrão micropapilar foi observado na maioria dos carcinomas mas com extensão variável; só em 8 casos (9%) atingiu 50% da massa tumoral, sendo estes carcinomas classificados de micropapilares.



Fig. 1. Gata com lesões mamárias múltiplas afectando as 2 cadeias mamárias.



Fig. 2. Lesão de grandes dimensões, ulcerada, envolvendo as mamas abdominal (nº3) e inguinal (nº4).

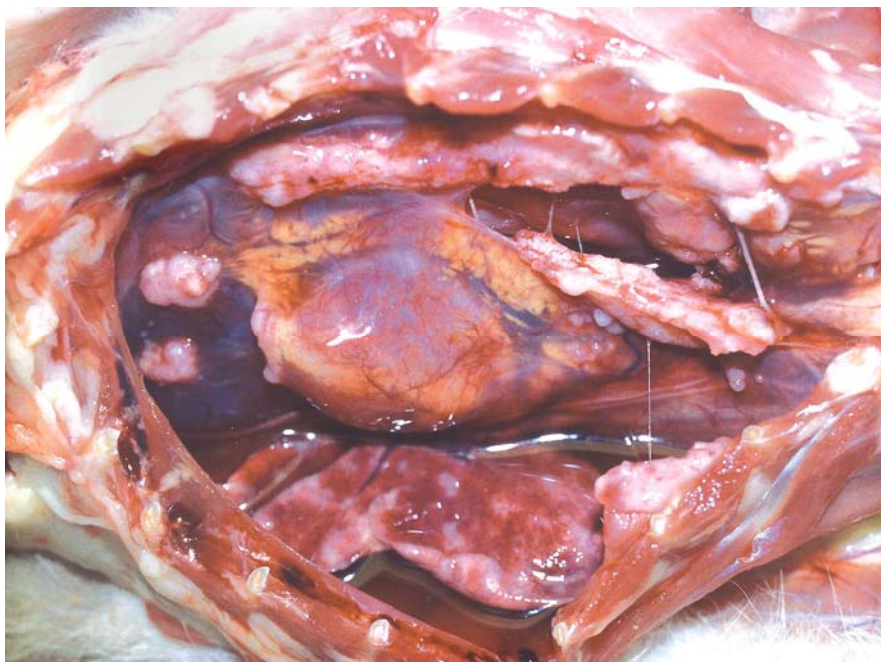


Fig. 3. Metástases de carcinoma de mama no pulmão, pericárdio e mediastino com efusão pleural.

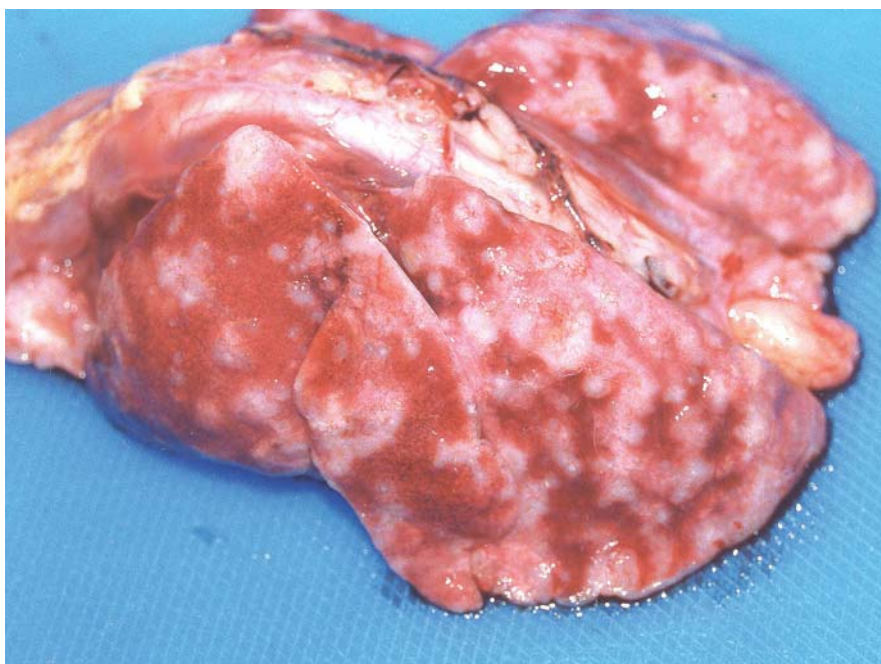


Fig. 4. Metástases pulmonares.

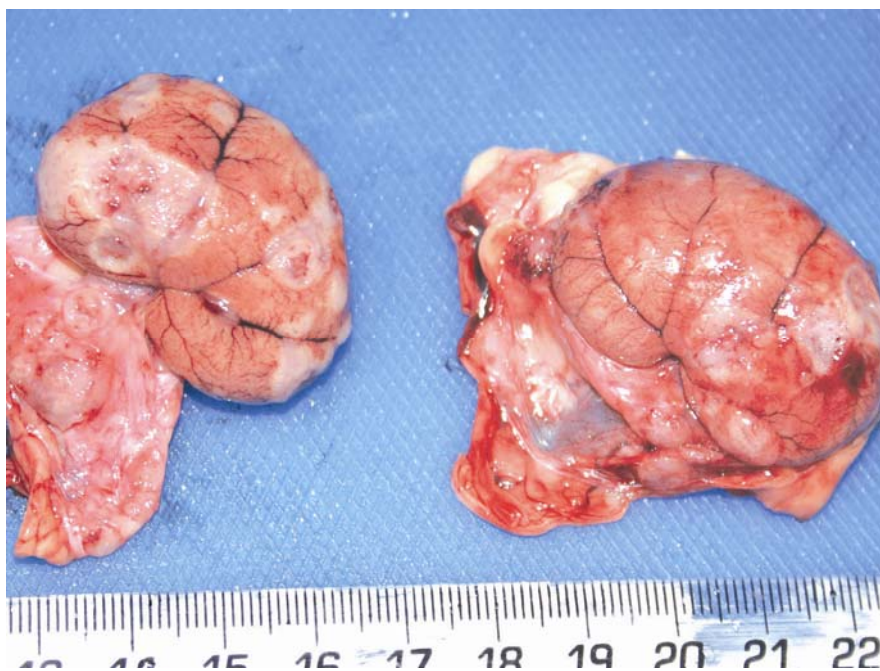


Fig. 5. Metástases renais bilaterais de carcinoma de mama.

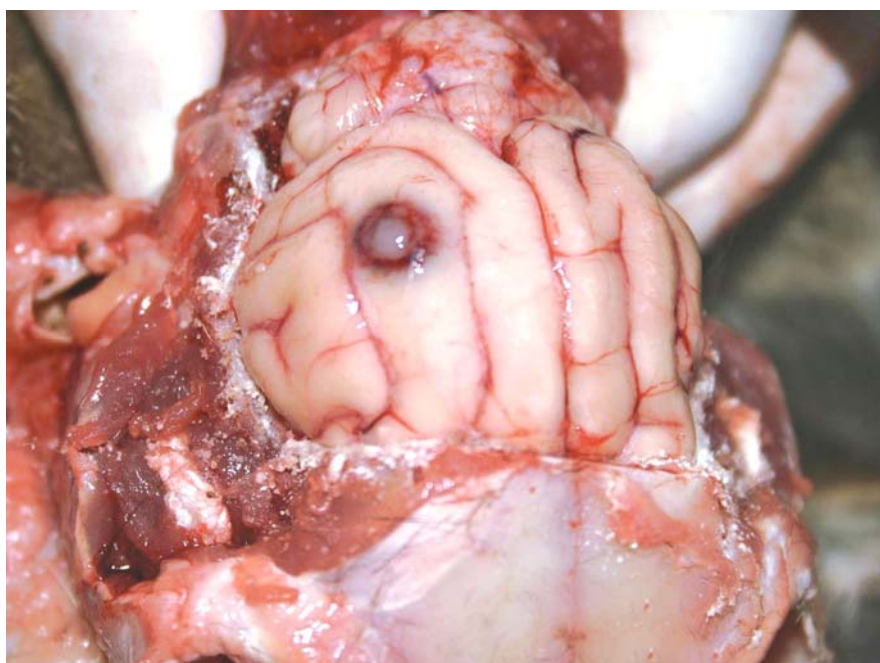


Fig. 6. Metástase cerebral.



Fig. 7. Secção transversal de neoplasia mamária evidenciando área de fibroadenoma (*) e cavidades quísticas com conteúdo gelatinoso.

Apesar de serem também relativamente frequentes, os padrões tubular e papilar, surgiam em pequena extensão, só predominando, cada um, em 4 carcinomas (4%). Observaram-se ainda 5 carcinomas (5%) com crescimento intraquístico. O padrão cribriforme foi frequentemente observado mas nenhum carcinoma foi assim classificado em virtude da sua extensão ser inferior a 50% da massa neoplásica total.

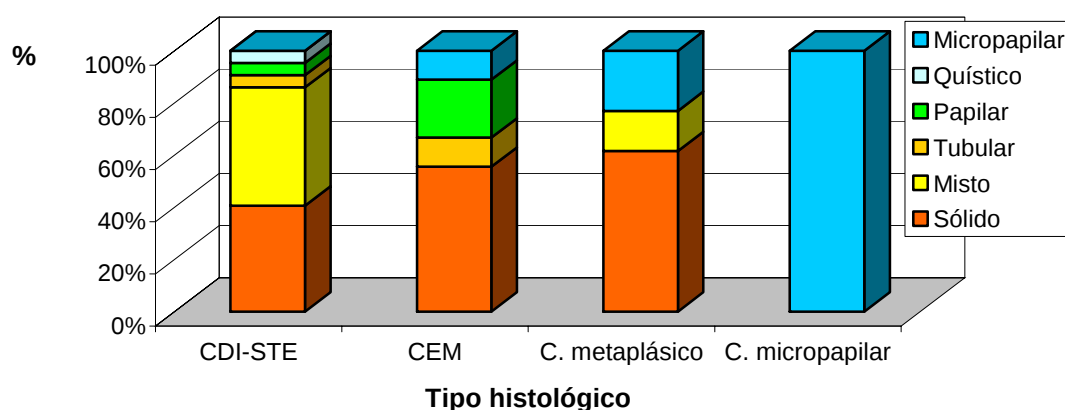


Fig. 8. Padrões arquiteturais predominantes nos vários tipos histológicos.

Quando analisámos a distribuição dos padrões arquiteturais predominantes nos vários tipos histológicos verificámos que o padrão sólido predominou nos carcinomas ductais sem

tipo específico (CDI-STE), nos carcinomas epiteliais-mioepiteliais (CEMs) e nos metaplásicos (fig. 8).

Tipo histológico

No quadro 7 encontram-se as frequências absolutas e relativas dos tipos histológicos de carcinoma analisados:

Quadro 7. Tipo histológico dos carcinomas.

Tipo histológico	n (%)
Carcinoma papilar <i>in situ</i>	1 (0,01)
Carcinoma ductal invasor sem tipo específico (CDI-STE)	65 (69,1)
Carcinoma epitelial-mioepitelial (CEM)	8 (8,5)
Carcinoma micropapilar invasor	8 (8,5)
Carcinoma metaplásico	12 (12,8)
Total	94 (100,0)

• *Carcinoma papilar “in situ”*

Esta lesão solitária de 2,2 cm de diâmetro, não ulcerada, foi observada numa gata Europeu Comum de 8 anos, na mama torácica da cadeia direita (D2). Caracterizou-se por proliferação intra-quística de papilas ramificadas com ausência de mioepitélio e áreas sólidas (fig. 9). As células cubóides, de grau nuclear 2, apresentavam focos de diferenciação apócrina. As mitoses eram raras e típicas.

• *Carcinoma ductal invasor sem tipo específico (CDI-STE)*

Foi o tipo de carcinoma mais frequentemente observado. Surgiu com maior frequência em gatas Europeu Comum, de idade avançada: 50% tinham idade superior a 11 anos. As dimensões eram muito variáveis mas, apenas 34% (n=25) das lesões tinham menos de 2 cm.

À observação microscópica caracterizaram-se pela proliferação de células pleomórficas com mitoses frequentes e atípicas. Trinta e sete tumores (56,9%) apresentaram grau nuclear 3 mas nenhum foi classificado de grau 1.

Observaram-se 2 populações celulares (fig. 10), uma constituída por células pequenas, cubóides, basófilas, com citoplasma escasso e núcleo redondo com cromatina grumosa, que se dispunham preferencialmente segundo o padrão sólido e/ou cribriforme (fig 11) e

apresentavam frequentemente abundante produção de mucinas (principalmente ácidas) (fig. 12), e focos de diferenciação condróide mesenquimatosa e/ou bem diferenciada. A outra população era constituída por células grandes, cubóides ou poliédricas, de citoplasma abundante, pálido, com núcleo eucromático e nucléolo proeminente, que adoptavam preferencialmente padrão micropapilar e/ou sólido (fig. 13). Apresentavam frequentemente diferenciação epidermóide, ocasionalmente segregavam mucinas mas, a raramente se associaram a metaplasia condróide. As duas populações constituíam lesões independentes na mesma mama, em nódulos em diferentes mamas de uma mesma gata mas, por vezes coexistiam na mesma lesão, observando-se células com características intermédias.

Os CDI-STE evidenciavam predomínio de padrão morfológico sólido (fig. 14) ou misto, e mais raramente padrão quístico (fig. 15) ou túbulo-papilar (fig. 16). A maioria era de grau histológico II (n=36; 55,4%), grau nuclear 3 (n=37; 57%) (fig. 17), estadio 3 (n=27; 41,5%), apresentava crescimento infiltrativo (69,2%; n=45) e, 35,4% dos casos (n=23) invadiam o músculo esquelético. A necrose era comum e extensa (n=59; 90,7%) e em alguns tumores observaram-se áreas de necrose de tipo comedo (fig. 18). A permeação vascular foi observada em 70,8% (n=46) dos casos e 21,5% (n=14) apresentavam metástases ganglionares no momento da excisão. A maioria dos carcinomas era de estadio 3 ou 4 (n=27; 41,5%); este tipo histológico incluiu 2 gatas com metástases à distância, uma das quais evidenciava 2 carcinomas distintos.

Oito CDI (11%) apresentaram focos metaplásicos inferiores a 10% da massa neoplásica total: em cinco observaram-se áreas de cartilagem mesenquimatosa e/ou bem diferenciada, em dois áreas de carcinoma epidermóide (fig. 19) e, uma lesão apresentou áreas condróides e epidermóides.

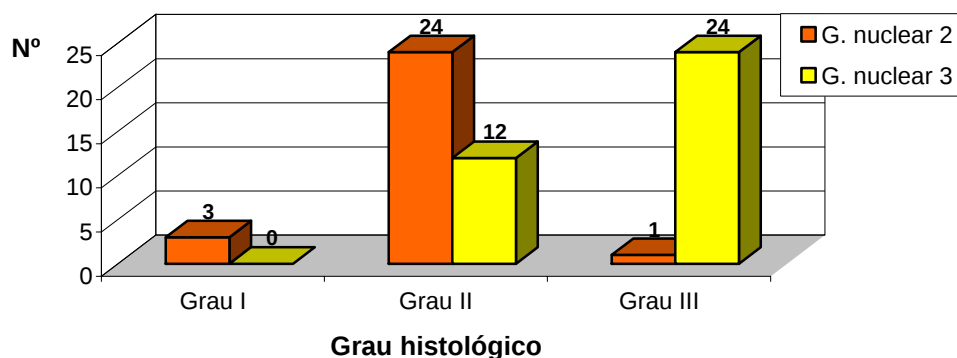


Fig. 17. Grau nuclear e grau histológico dos CDI-STE.

O infiltrado inflamatório, de tipo linfoplasmocitário, era escasso ou moderado. Em 8 carcinomas (12,3%) observaram-se células gigantes multinucleadas (CGM) de tipo osteoclasto (n=7) (fig. 20) e tumorais (n=1).

• ***Carcinomas epiteliais-mioepiteliais (CEM)***

Os CEMs constituíram 8,5% da totalidade dos carcinomas observados. Surgiram com maior frequência em gatas Siamesas (50%; n=4), com idade inferior a 8 anos (50%; n=4). Eram lesões bem circunscritas mas não capsuladas (fig 21) e 62% (n=5) apresentavam dimensão inferior a 2 cm.

Ao exame microscópico eram constituídos por células cubóides ou redondas, com atipia citológica moderada, que formavam cordões sólidos, ninhos ou túbulos (fig. 22). A rodear as células epiteliais observou-se camada contínua de células mioepiteliais, cubóides ou fusiformes, com atipia citológica baixa a moderada, uma relação núcleo:citoplasma elevada, limites indistintos e ocasionais figuras de mitose. Estas células, por vezes só identificadas pelo recurso a marcadores de células basais/mioepiteliais, formavam ocasionalmente camadas estratificadas (fig. 23).

O padrão cordonal (sólido) foi o mais frequentemente observado (62,5%; n=5) mas, foram observadas áreas tubulares em 7 casos (87,5%). Alguns carcinomas evidenciavam pequenas áreas papilares e fendas semelhantes aos fibroadenomas. Um carcinoma evidenciou padrão papilar intraquístico; era uma lesão multicêntrica por disseminação intraductal do processo neoplásico, de padrão papilar invertido, com vários pontos de adesão ao epitélio ductal.

Da série de CEMs só um tumor era ulcerado (13%) e apenas 3 (36%) apresentaram áreas de necrose extensa. A maioria era de grau nuclear 2 (n=5; 62,5%), grau histológico II (n=5; 62,5%), estadio 1 (n=6; 75%), com mitoses raras (fig. 24). Em 7 carcinomas (88%) observaram-se focos de micro-invasão estromal. O estroma era escasso e fibroso, e o infiltrado inflamatório raro (n=7; 88%) e de tipo linfoplasmocitário. Em 2 lesões (25%) observaram-se áreas de diferenciação epidermóide e 4 apresentavam material mucinoso positivo ao PAS no interior de estruturas tubulares. Três carcinomas apresentaram células gigantes multinucleadas de tipo osteoclasto (fig. 25).

Uma lesão apresentou grau nuclear 3 e grau histológico III. Na periferia, o componente epitelial desta lesão assumiu uma morfologia micropapilar com invasão do estroma, êmbolos e metástases ganglionares micropapilares no momento da exérese.

• *Carcinomas metaplásicos*

Este tipo histológico constituiu 13% da totalidade dos carcinomas analisados e caracterizou-se pela presença de um componente metaplásico superior a 10% da massa neoplásica total. Foram observados 3 subtipos: 1) carcinomas com elementos heterólogos, cartilagem mesenquimatosa e/ou diferenciada (n=4; 33%); 2) carcinomas com áreas epidermóides (n=6; 50%); 3) proliferações de células fusiformes (n=2; 16,7%). Alguns carcinomas evidenciaram co-existência de vários elementos metaplásicos (fig. 26). Todos os carcinomas eram invasores e infiltravam frequentemente o músculo esquelético (n=8; 67%).

Em 4 lesões o carcinoma invasor associou-se a carcinoma epidermóide com extensão variável, que num tumor era superior a 90% da massa neoplásica total. O CDI, de morfologia sólida, mista ou menos frequentemente tubular, apresentava atipia citológica moderada, e o componente epidermóide evidenciava atipia moderada a elevada e queratinização frequente (fig. 27). A maioria era ulcerada (n=3), de grau histológico III, com necrose extensa (n=3) e mitoses frequentes. Eram todos invasores (2 com invasão da camada muscular), com permeação vascular. O infiltrado inflamatório era abundante (n=3), de tipo linfoplasmocitário. Algumas lesões apresentavam piogranulomas em reacção à presença de queratina.

Seis carcinomas apresentaram áreas condróides. Eram na sua maioria constituídos por células pequenas, basofílicas, com elevado pleomorfismo celular e nuclear (4 eram de grau nuclear 3), que segregavam mucinas ácidas (5/6). Apresentavam áreas de matriz mixóide ou condróide mesenquimatosa a separar trabéculas ou células isoladas cubóides, fusiformes ou estreladas (fig. 28). Mais raramente observaram-se focos de cartilagem bem diferenciada. Uma lesão evidenciou área de carcinoma fusiforme e epidermóide e, o carcinoma invasor adoptava morfologia micropapilar. A maioria destas lesões era de grau III (4/6) e estadio 3 (5/6).

Observaram-se ainda 2 carcinomas constituídos por células fusiformes pleomórficas, de citoplasma claro ou acidófilo, dispostas em fascículos; eram lesões de grau histológico III, grau nuclear 3, uma de estadio 2 e outra 3, de limites arredondados, circunscritos (fig. 29 e 30). Uma lesão associou-se a CDIS e a outra apresentava focos de células poliédricas, acidófilas, de citoplasma abundante, com pouca coesão celular, e áreas mixóides. As lesões invadiam o estroma mas não se observaram focos de diferenciação epidermóide e/ou êmbolos linfáticos. Um tumor apresentava células gigantes multinucleada de tipo osteoclasto e tumorais.

• ***Carcinomas micropapilares invasores***

Surgiram em gatas Europeu Comum (n=4; 50%) e Siamesas (n=4; 50%) de idade avançada (média 12 anos; variando de 11 a 15 anos) e apresentaram em média 2,9 cm de diâmetro (mínimo 1 cm - máximo 7 cm).

À observação microscópica apresentaram predomínio de padrão micropapilar caracterizado por pequenos agregados papilares avasculares (sem estroma conjuntivo) (fig. 31 e 32) mas, só um carcinoma era uma forma pura, com padrão micropapilar em 90% da massa tumoral. O número de padrões morfológicos observados variou de 2 a 4.

Todas as lesões eram de grau histológico III, grau nuclear 3 e apresentavam focos de diferenciação epidermóide (n=8; 100%) e/ou apócrina (n=6; 75%), invasão do estroma (n=6; 75%) ou da camada muscular (n=2; 25%). Frequentemente observaram-se extensas áreas de necrose (n=7; 87,5%) e secreção de mucinas (n=7; 87,5%), ainda que pouco abundante. Apenas 37,5% (n=3) eram ulceradas e 87,5% (n=7) dos casos encontravam-se em estadio 3.

A maioria dos carcinomas apresentava êmbolos (n=6; 75%) (fig. 33) e 2 (25%) metástases ganglionares de padrão micropapilar. A abundância do infiltrado inflamatório foi variável. Na periferia de 5 carcinomas observou-se CDIS de padrão micropapilar puro ou associado ao padrão sólido e/ou papilar.

1.1. ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS DIFERENTES CARCINOMAS

Os carcinomas surgiram principalmente em gatas de raça Europeu Comum com idade superior a 11 anos. A raça Siamesa foi a segunda mais afectada e evidenciou neoplasias em idades mais precoces (8-11 anos). As gatas cruzadas desenvolveram carcinomas em média aos 15,5 anos (quadro 8). Estas diferenças não atingiram significado estatístico (p=0,20)

Quadro 8. Associação entre a raça e a idade das gatas com neoplasias malignas.

Idade (anos) (n=88)	Raça			
	Europeu Comum	Siamesa	Persa	Gatas cruzadas
<8	5 (10,0)	5 (15,6)	0 (0,0)	0 (0,0)
8-11	19 (38,0)	15 (46,9)	0 (0,0)	0 (0,0)
>11	26 (52,0)	12 (37,5)	2 (100,0)	4 (100,0)

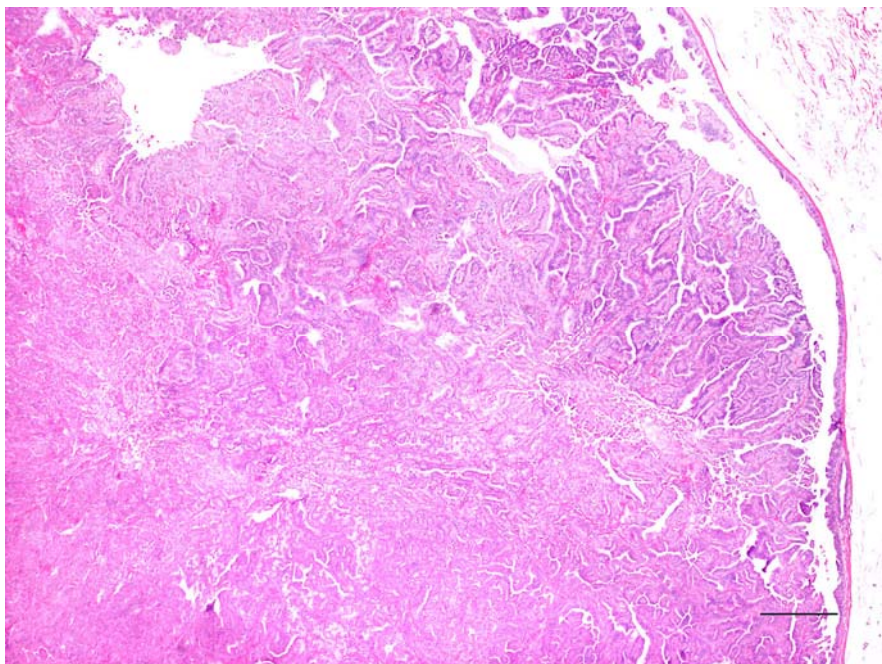


Fig. 9. Carcinoma papilar *in situ*. Estalão = 300 μ m.

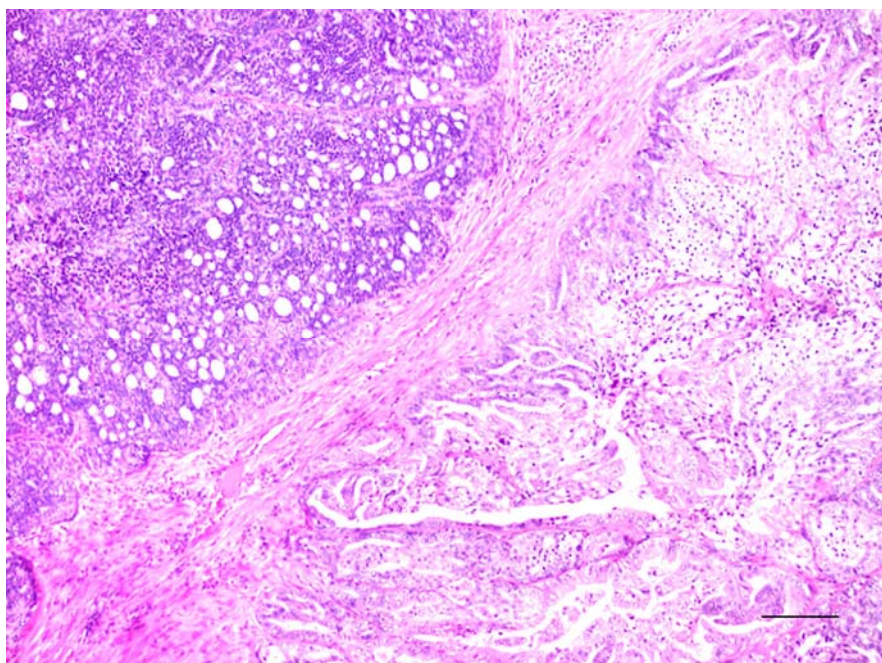


Fig. 10. CDI-STE evidenciando 2 populações celulares, uma basófila, outra acidófila. Estalão = 120 μ m.

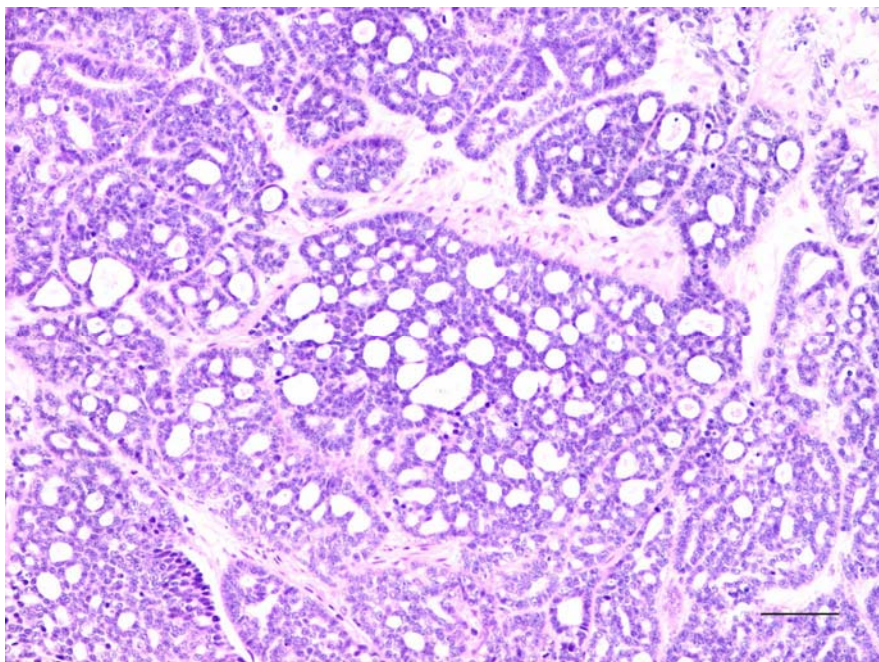


Fig. 11. CDI-STE com áreas cribriformes. Estalão = 60 μ m.

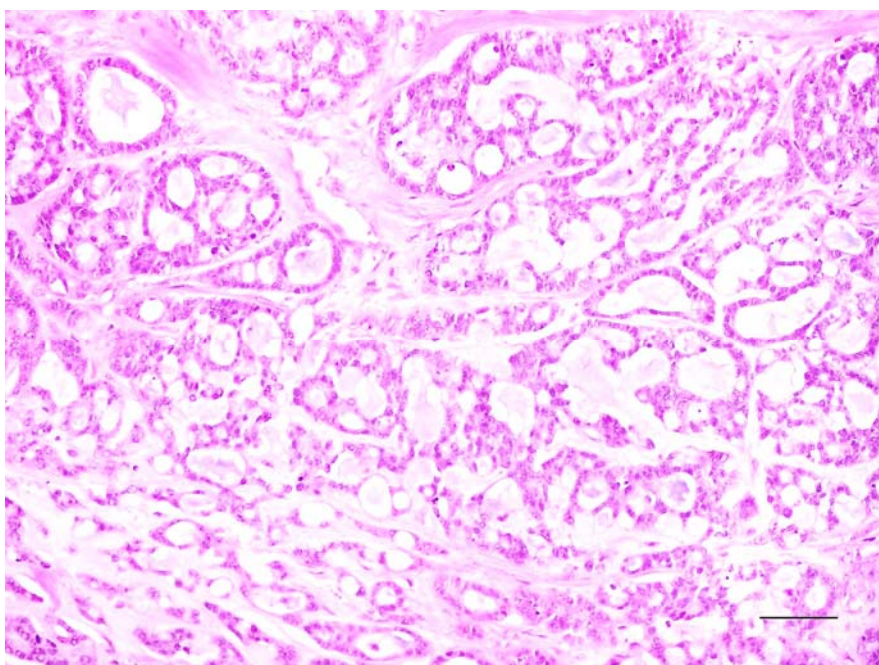


Fig. 12. CDI-STE com abundante produção de mucinas. Estalão = 60 μ m.

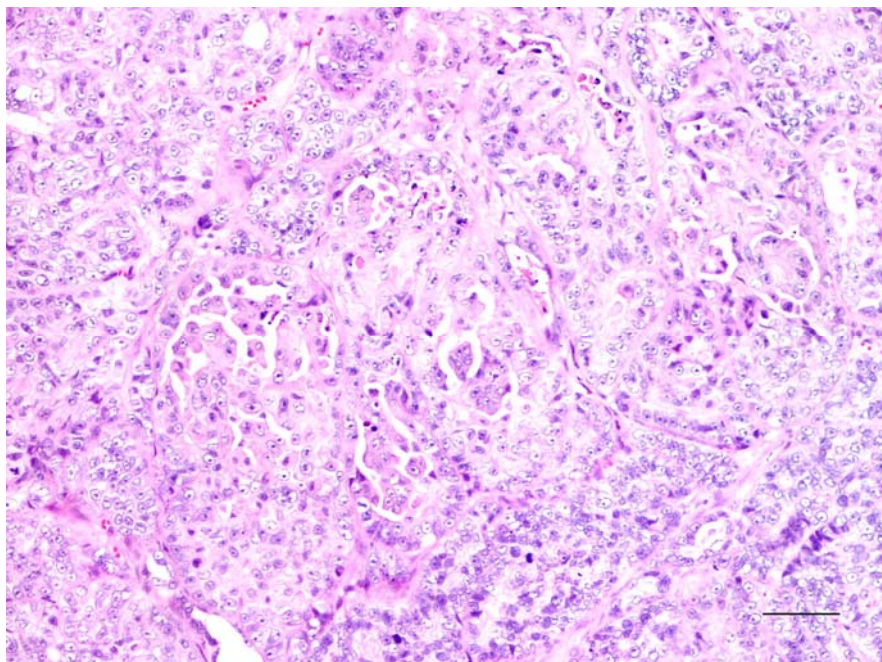


Fig. 13. CDI-STE com áreas glomerulóides, micropapilares. Estalão = 60 μ m.

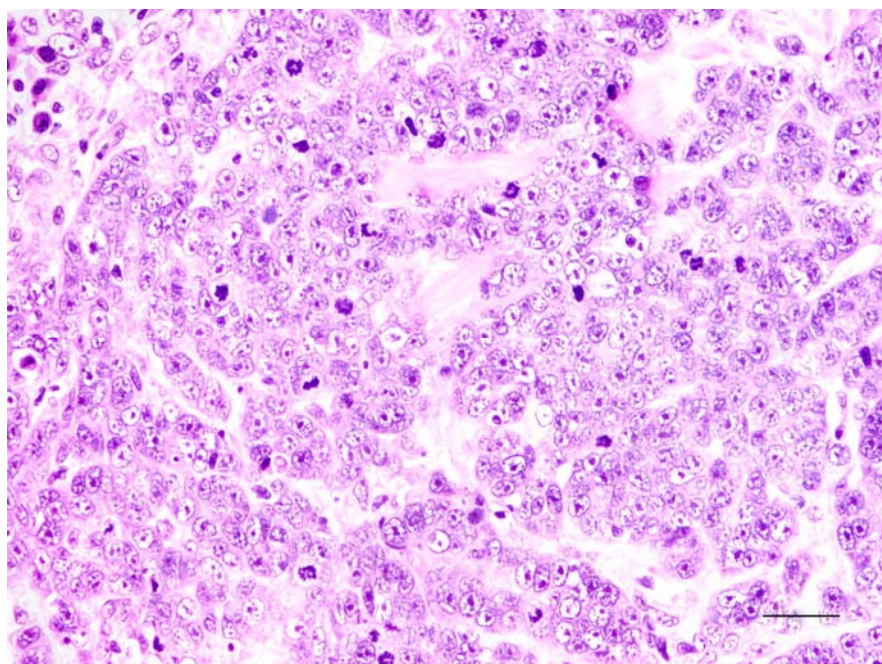


Fig. 14. CDI-STE de padrão sólido e alto grau histológico. Estalão = 30 μ m.

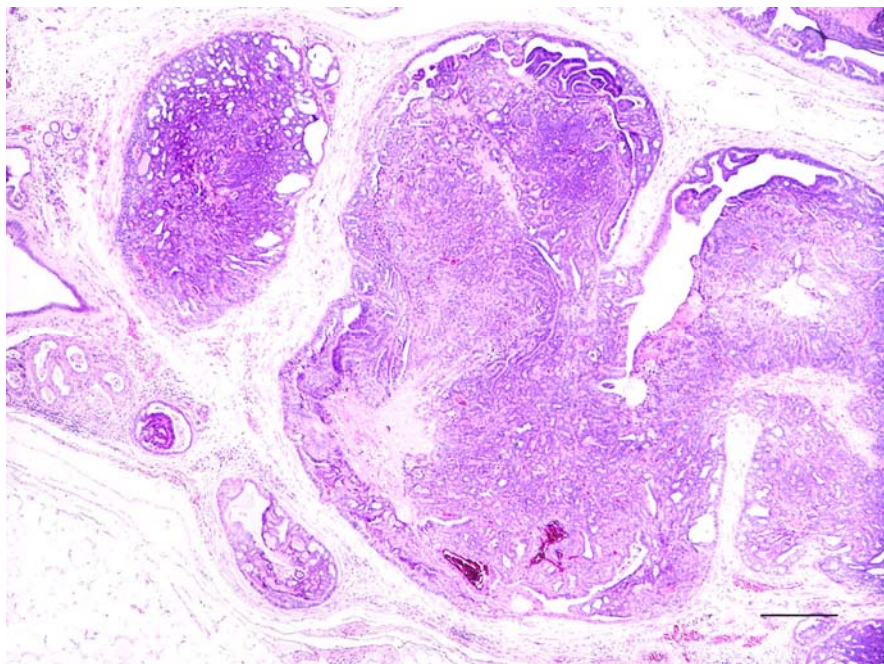


Fig. 15. CDI-STE de padrão quístico. Estalão = 300 μ m.

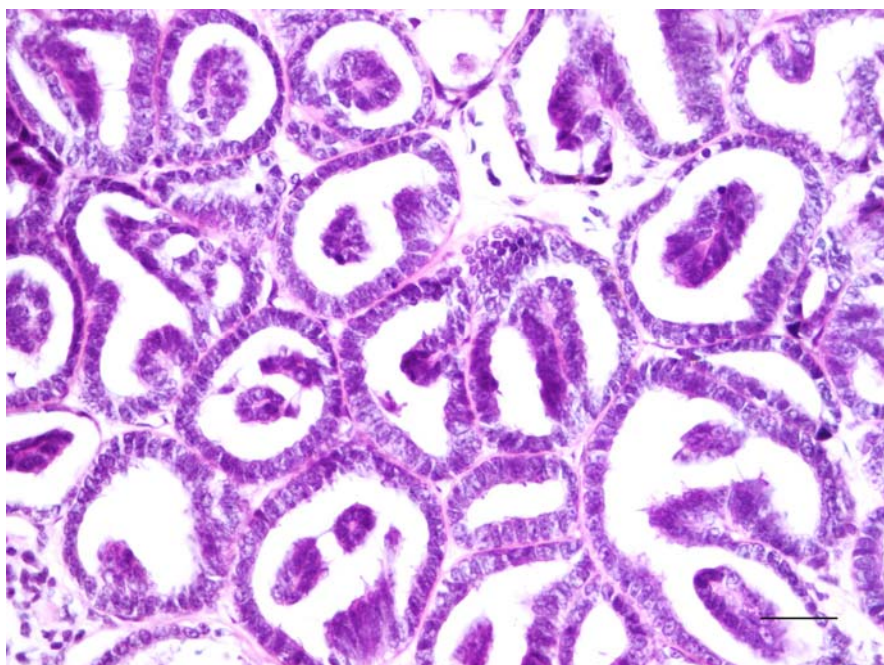


Fig. 16. CDI-STE de padrão túbulo-papilar. Estalão = 30 μ m.

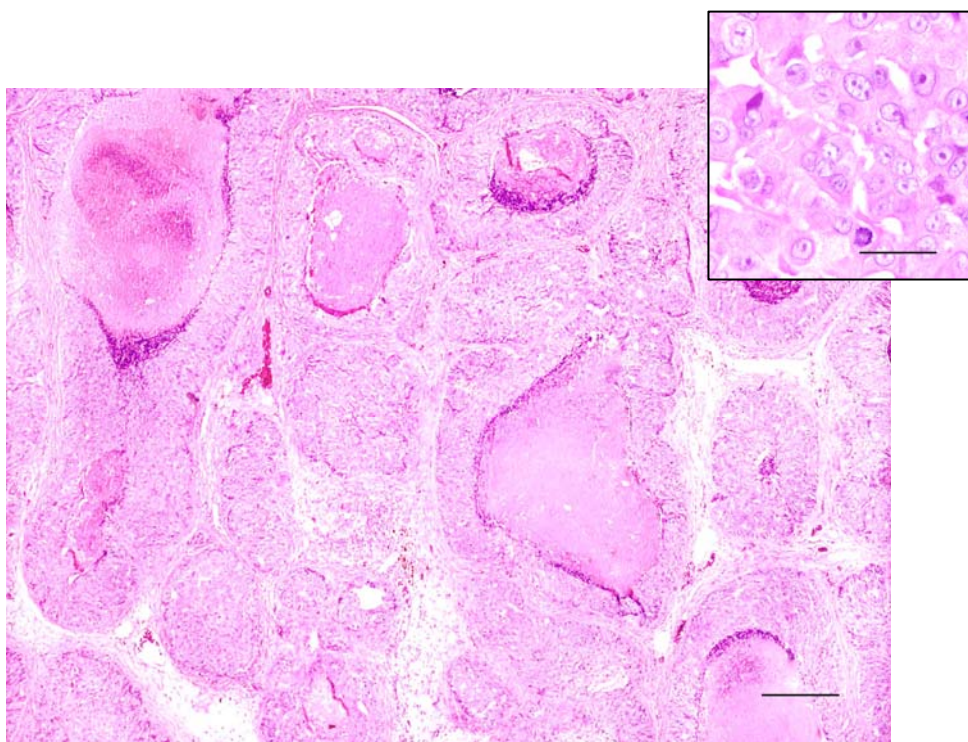


Fig. 18. CDI-STE de alto grau histológico com áreas de necrose de tipo comedo. Estalão = 300 μ m; Estalão insert = 30 μ m.

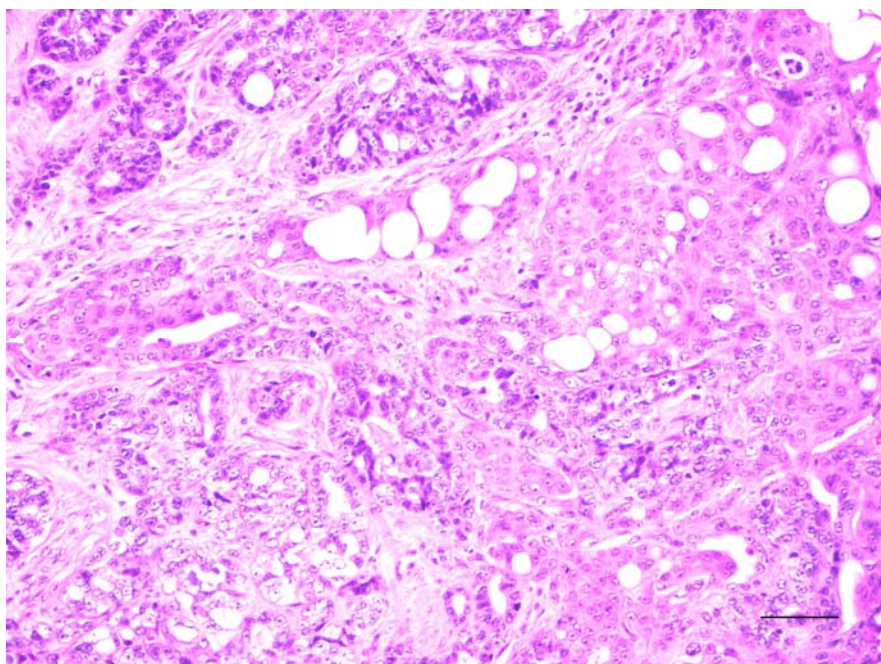


Fig. 19. CDI-STE com áreas de diferenciação epidermóide. Estalão = 60 μ m.

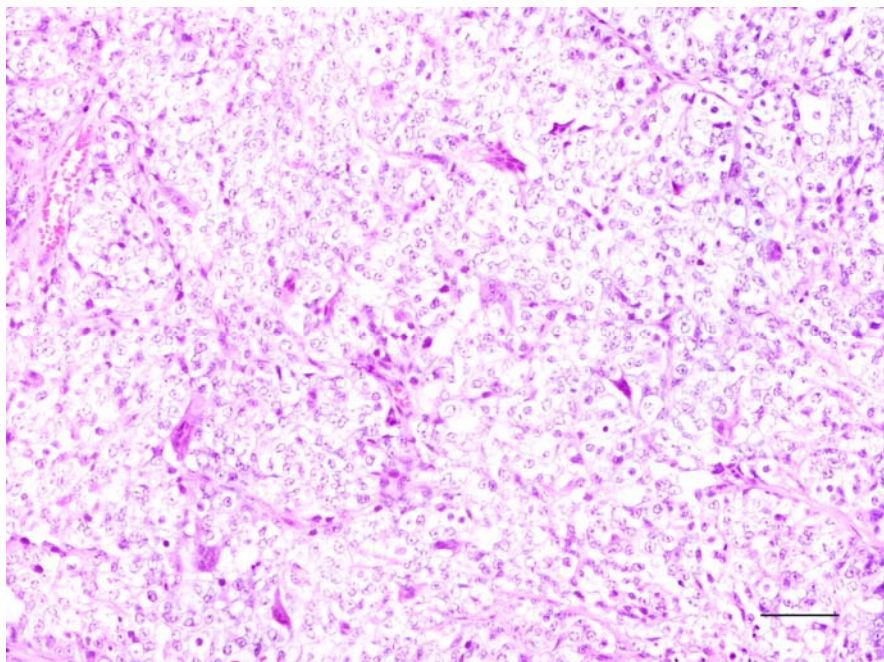


Fig. 20. CDI-STE de padrão sólido com células de citoplasma clarificado e presença de células gigantes multinucleadas de tipo osteoclasto. Estalão = 60 μ m.

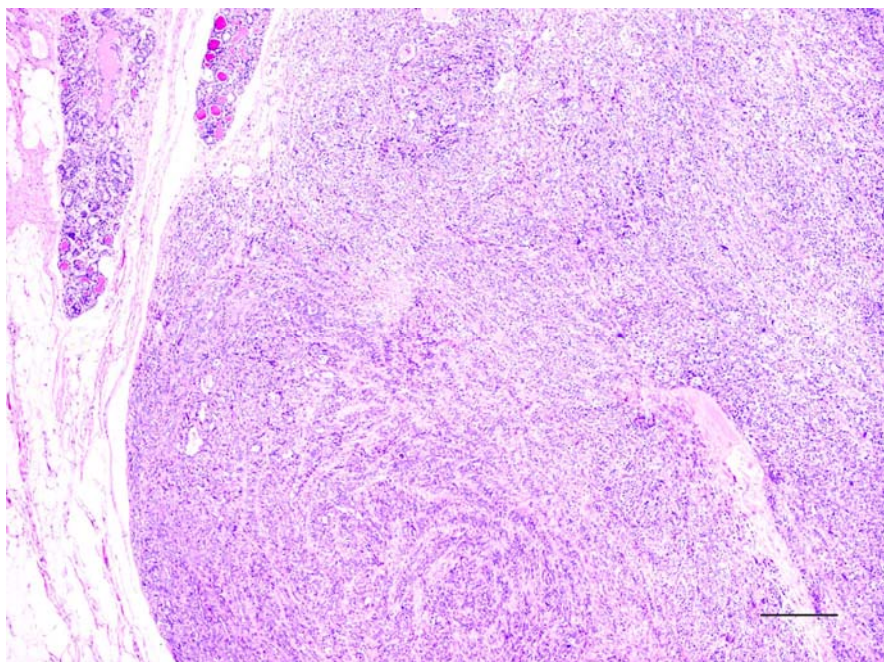


Fig. 21. CEM com limites bem definidos e crescimento expansivo. Estalão = 300 μ m.

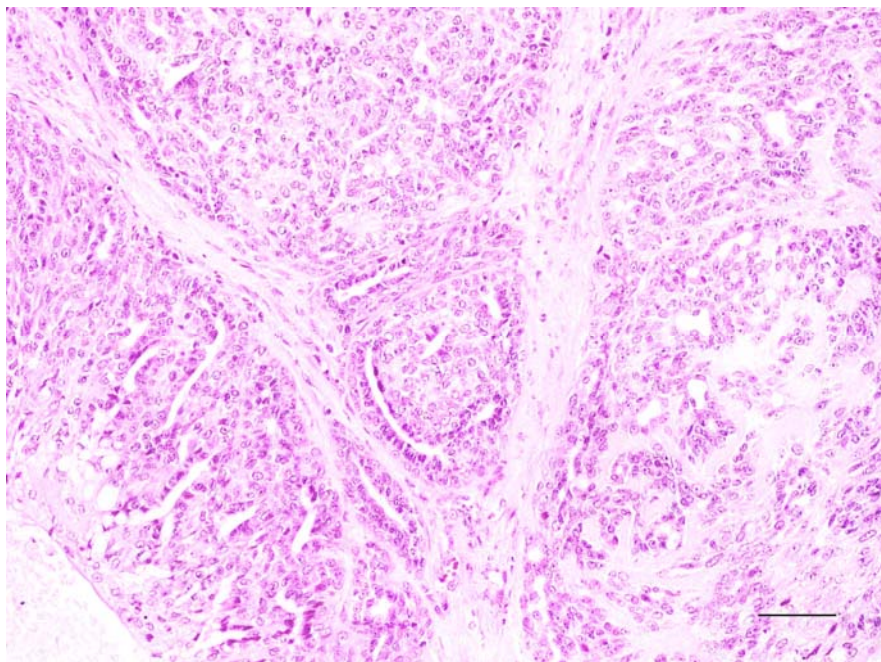


Fig. 22. CEM evidenciando áreas tubulares e estroma escasso. Estalão = 60 μ m.

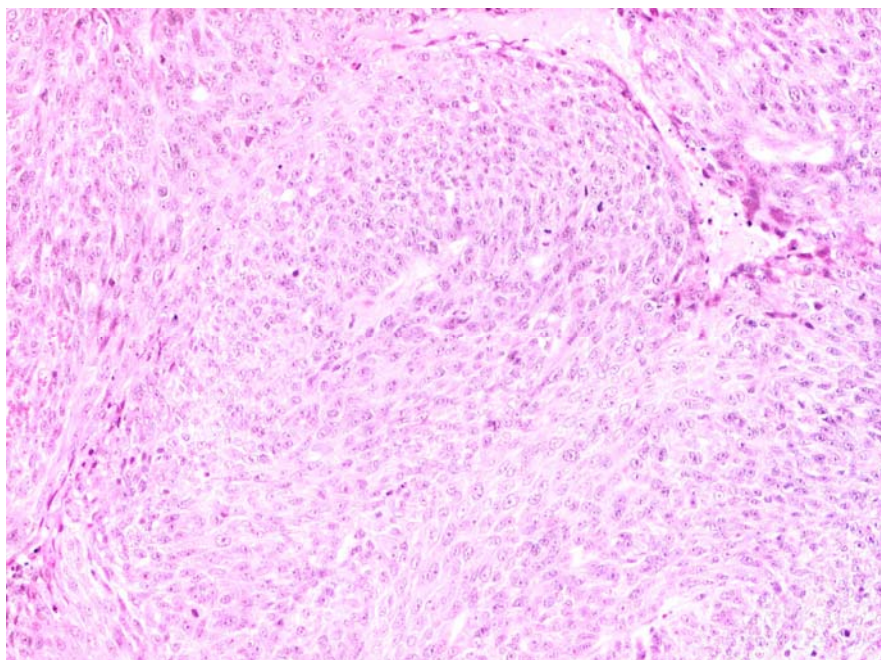


Figura 23. CEM de padrão papilar invertido, apresentando abundante população fusiforme de natureza mioepitelial. Estalão = 60 μ m.

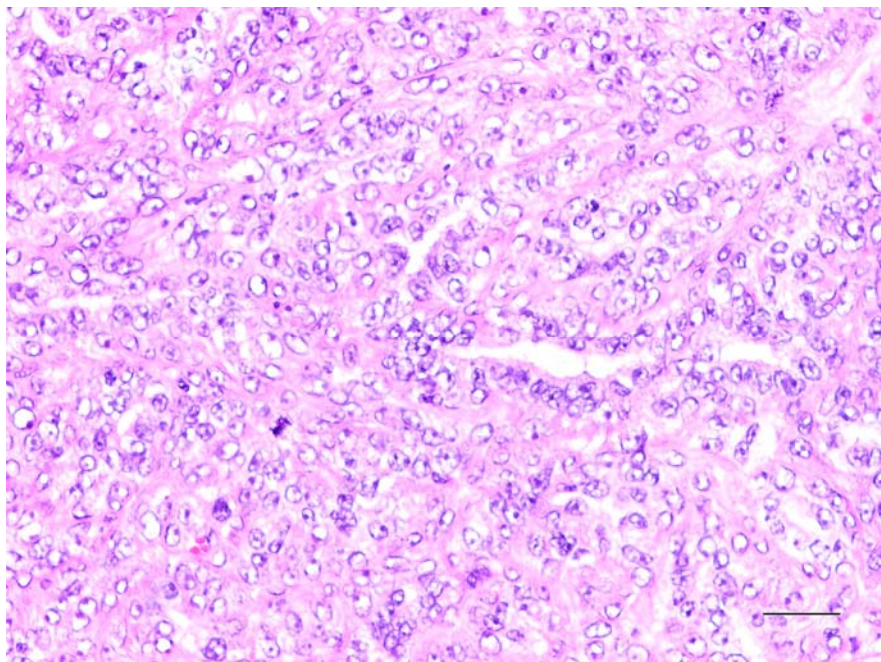


Fig. 24. CEM evidenciando elevado número de células mioepiteliais de citoplasma acidófilo, algumas em mitose. Estalão = 30 μ m.

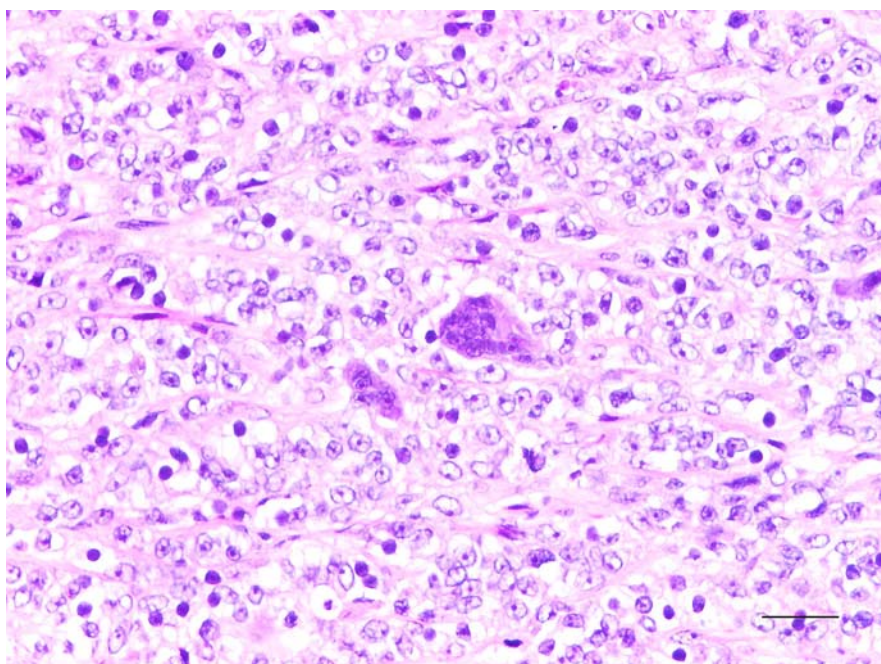


Fig. 25. CEM apresentando cordões sólidos, estroma escasso e células gigantes multinucleadas. Estalão = 30 μ m.

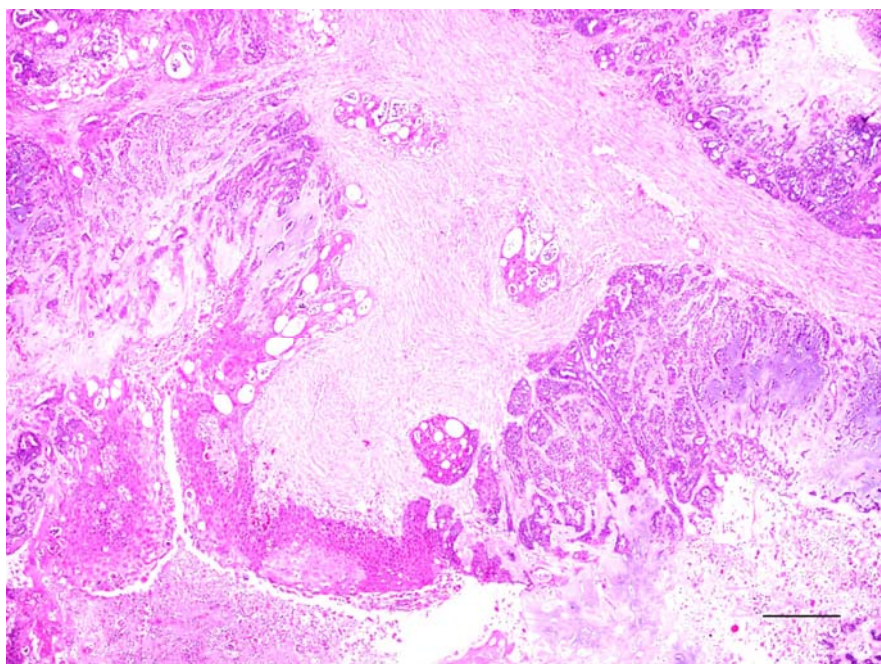


Fig. 26. Carcinoma metaplásico apresentando áreas epidermóides e condróides mesenquimatosas. Estalão = 300 μ m.

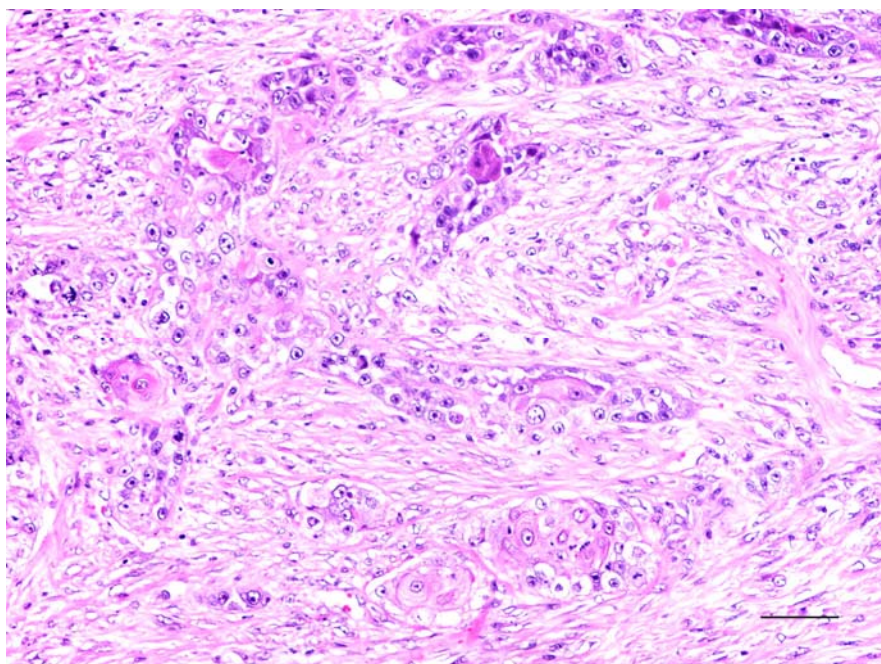


Fig. 27. Carcinoma metaplásico evidenciando ninhos de células epidermóides invasoras e estroma desmoplásico. Estalão = 60 μ m.

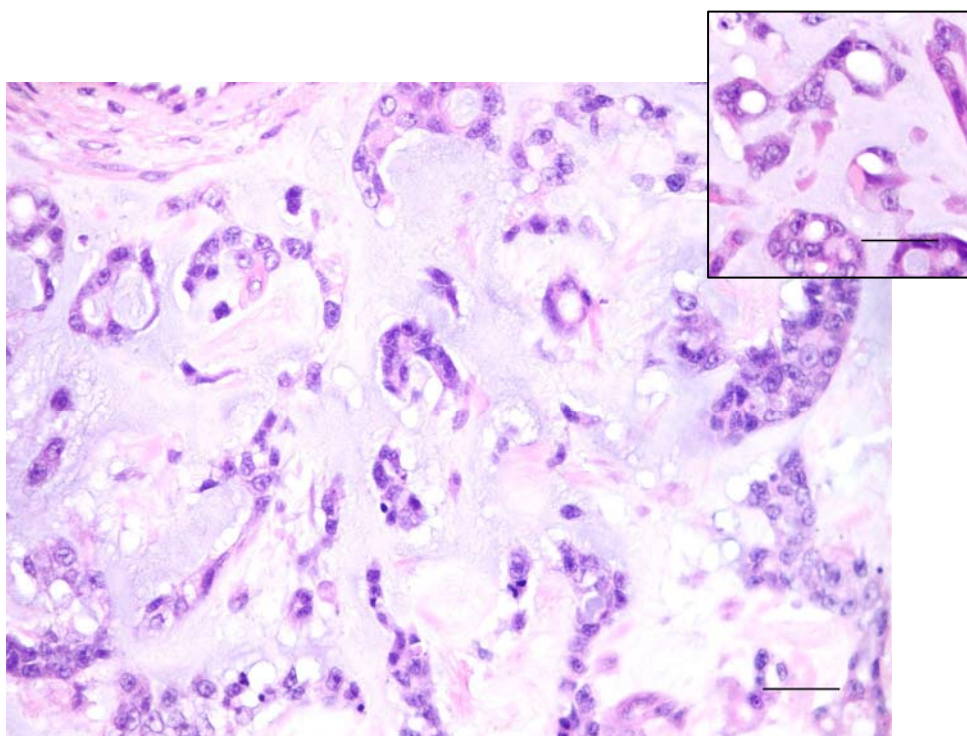


Fig. 28. Carcinoma metaplásico evidenciando áreas de cartilagem mesenquimatosa. Estalão = 30 μ m. Estalão insert = 30 μ m.

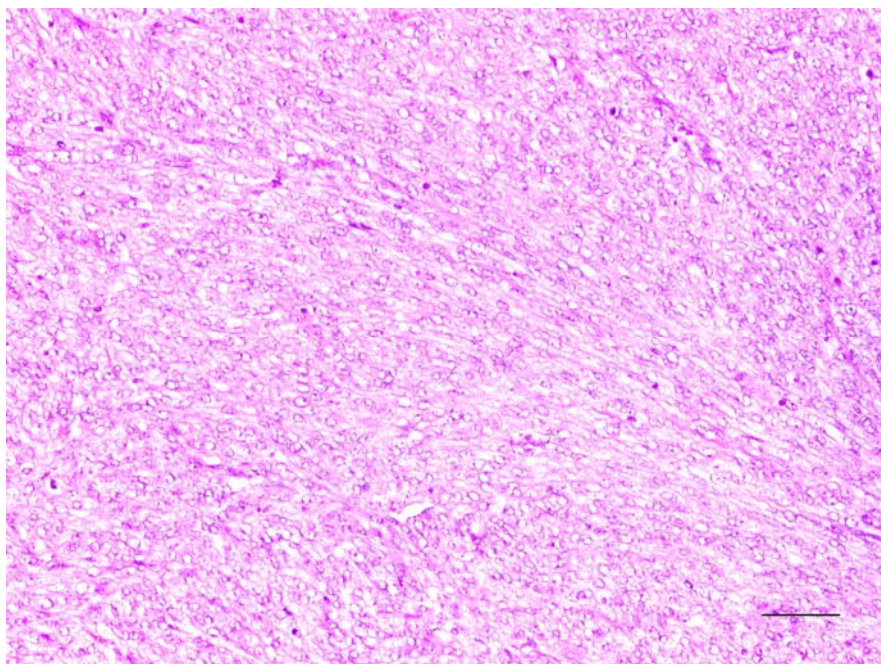


Fig. 29. Carcinoma de células fusiformes de alto grau nuclear com disposição fascicular. Estalão = 60 μ m.

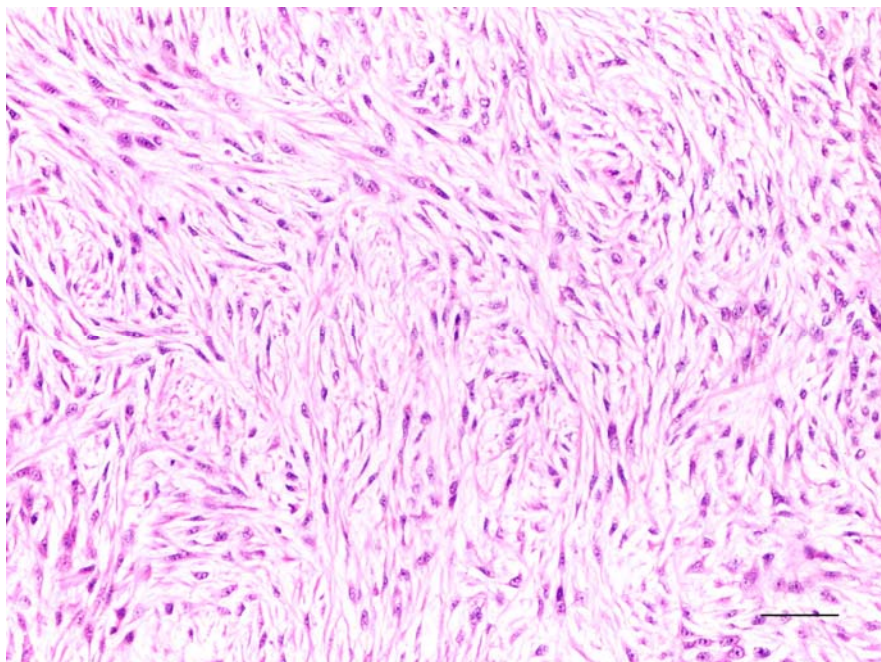


Fig. 30. Carcinoma de células fusiformes. Estalão = 60 μ m.

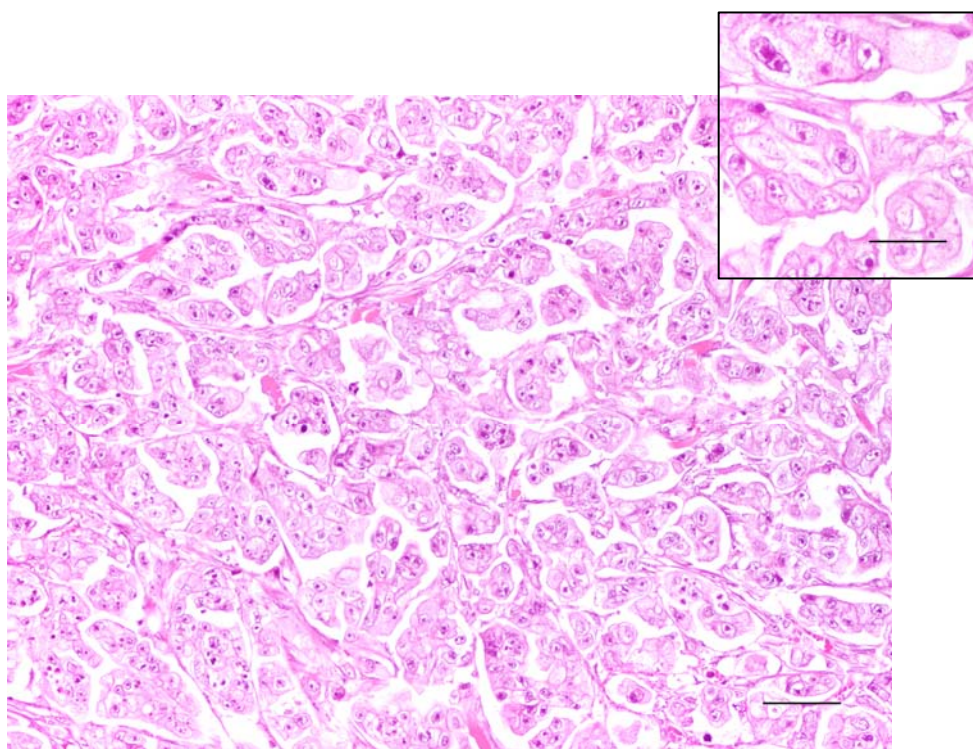


Fig. 31. Carcinoma micropapilar invasor de alto grau histológico e nuclear. Os agregados celulares encontram-se em lacunas mimetizando permeação linfática. Estalão = 60 μ m. Estalão insert = 30 μ m.

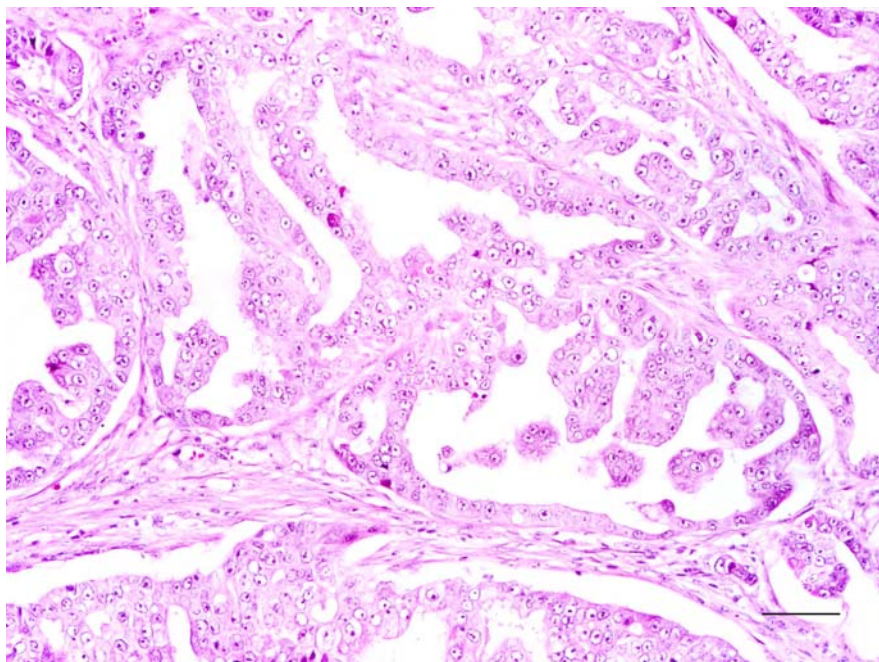


Fig. 32. Pequenos aglomerados papilares (micropapilas) sem estroma conjuntivo. Estalão = 60 μ m.

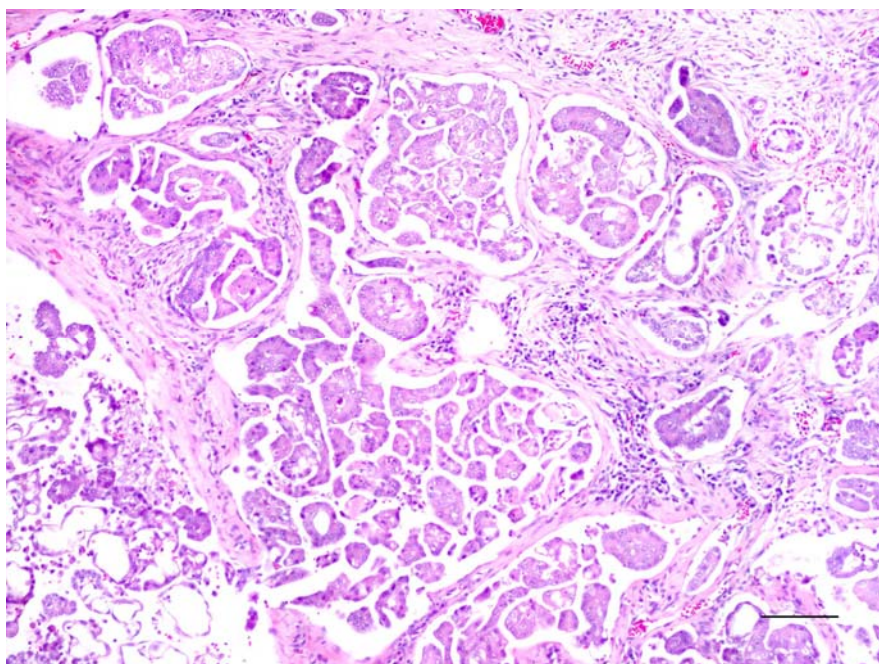


Fig. 33. Êmbolos linfáticos de padrão micropapilar. Estalão = 120 μ m.

TIPO HISTOLÓGICO E CRITÉRIOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS

Os vários tipos histológicos evidenciaram diferenças quanto aos critérios clínico-patológicos, contudo, o teste Qui-quadrado foi sistematicamente não válido. Por conseguinte, no quadro 9 apresentamos apenas as frequências absolutas e relativas.

Os CEMs surgiram maioritariamente em gatas de raça Siamesa, com menos de 8 anos, enquanto os carcinomas metaplásicos e os CDI-STE afectaram principalmente gatas Europeu Comum de idade superior a 11 anos. O carcinoma micropapilar distribuiu-se de forma equitativa pelas raças Europeu Comum e Siamesa e ocorreu também em idades avançadas. Também nas dimensões se observaram diferenças: 62,5% (n=5) dos CEMs tinham menos de 2 cm de diâmetro, mas a maioria dos outros tipos histológicos era de dimensão superior.

A ulceração cutânea surgiu principalmente associada aos carcinomas metaplásicos (n=8; 66,7%) e micropapilares (n=3; 37,5%). A maioria dos CEMs era de estadio 1 mas, a maioria dos carcinomas micropapilares e metaplásicos era de estadio 3.

Com excepção dos CEMs, na maioria dos tipos tumorais observaram-se extensos focos de necrose. Quando analisámos o grau histológico verificámos que nos carcinomas metaplásicos e micropapilares predominou o grau III, enquanto nos restantes tipos tumorais predominou o grau II. Os carcinomas com maior atipia nuclear eram também metaplásicos ou micropapilares.

A maioria dos CEMs apresentou crescimento expansivo e focos de micro-invasão estromal mas, nos outros tipos histológicos, predominou o crescimento infiltrativo, com invasão frequente. Salientou-se o carcinoma metaplásico com invasão da camada muscular em 66,7% (n=8) dos casos. A permeação vascular foi comum nos carcinomas felinos com excepção do CEM. Em relação à metastização salientaram-se novamente os carcinomas metaplásicos com as frequências mais elevadas (n=5; 41,7%) e os CEM com as mais baixas (n=1; 12,5%).

A diferenciação epidermóide foi comum em todos os tipos histológicos com excepção do CEM. O infiltrado inflamatório, de tipo linfoplasmocitário, apresentou abundância variável nos vários tipos histológicos e dentro dos tumores de cada tipo mas, foi menos evidente nos CEMs.

Quadro 9. Associação do tipo histológico com as variáveis clínico-patológicas.

Parâmetro	CDI-STE n (%)	CEM n (%)	C metaplásico n (%)	C micropapilar n (%)
Raça				
Europeu comum	38 (58,5)	3 (37,5)	7 (58,3)	4 (50,0)
Siamês	23 (35,4)	4 (50,0)	3 (25,0)	4 (50,0)
Persa	1 (1,5)	0 (0,0)	1 (8,3)	0 (0,0)
Cruzado	3 (4,6)	1 (12,5)	1 (8,3)	0 (0,0)
Idade (anos) (n=88)				
<8	6 (9,7)	4 (50,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
8-11	25 (40,3)	3 (37,5)	2 (20,0)	3 (42,9)
>11	31 (50,0)	1 (12,5)	8 (80,0)	4 (57,1)
Tamanho (cm)				
<2	23 (35,4)	5 (62,5)	1 (8,3)	2 (25,0)
2-3	25 (38,5)	2 (25,0)	5 (41,7)	3 (37,5)
>3	17 (26,2)	1 (12,5)	6 (50,0)	3 (37,5)
Multifocalidade (n=86)				
Solitárias	11 (18,0)	2 (25,0)	3 (30,0)	1 (14,3)
Múltiplas	50 (82,0)	6 (75,0)	7 (70,0)	6 (85,7)
Ulceração				
Ausente	48 (73,8)	7 (87,5)	4 (33,3)	5 (62,5)
Presente	17 (26,2)	1 (12,5)	8 (66,7)	3 (37,5)
Necrose				
Ausente	2 (3,1)	3 (37,5)	0 (0,0)	0 (0,0)
Células isoladas	4 (6,2)	2 (25,0)	1 (8,3)	1 (12,5)
Extensa	59 (90,7)	3 (37,5)	11 (91,7)	7 (87,5)
Grau histológico				
Grau I	3 (4,6)	2 (25,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Grau II	36 (55,4)	5 (62,5)	3 (25,0)	0 (0,0)
Grau III	26 (40,0)	1 (12,5)	9 (75,0)	8 (100,0)
Grau nuclear				
Grau 2	28 (43,1)	5 (62,5)	4 (33,3)	2 (25,0)
Grau 3	37 (56,9)	3 (37,5)	8 (66,7)	6 (75,0)
Estadio TNM				
I	19 (29,2)	6 (75,0)	1 (8,3)	1 (12,5)
II	19 (29,2)	0 (0,0)	4 (33,3)	2 (25,0)
III/IV	27 (41,5)	2 (25,0)	7 (58,3)	5 (62,5)
Invasão				
Ausente	0 (0,0)	1 (12,5)	0 (8,3)	0 (0,0)
Estroma	42 (64,6)	7 (87,5)	4 (33,3)	6 (75,0)
Muscular	23 (35,4)	0 (0,0)	8 (66,7)	2 (25,0)
Padrão de crescimento				
Expansivo	20 (30,8)	6 (75,0)	3 (25,0)	4 (50,0)
Infiltrativo	45 (69,2)	2 (25,0)	9 (75,0)	4 (50,0)
Diferenciação epidermóide				
Ausente	19 (29,2)	6 (75,0)	2 (16,7)	0 (0,0)
Presente	46 (70,8)	2 (25,0)	10 (83,3)	8 (100,0)
Infiltrado inflamatório				
Escasso	26 (40,0)	7 (87,5)	6 (50,0)	3 (37,5)
Moderado	20 (30,8)	1 (12,5)	2 (16,7)	2 (25,0)
Abundante	19 (29,2)	0 (0,0)	4 (33,3)	3 (37,5)
Permeação vascular				
Ausente	19 (29,2)	7 (87,5)	2 (16,7)	1 (12,5)
Presente	46 (70,8)	1 (12,5)	10 (83,3)	7 (87,5)
Metástases ganglionares (N)				
N0	51 (78,5)	7 (87,5)	7 (58,3)	6 (75,0)
N1	14 (21,5)	1 (12,5)	5 (41,7)	2 (25,0)

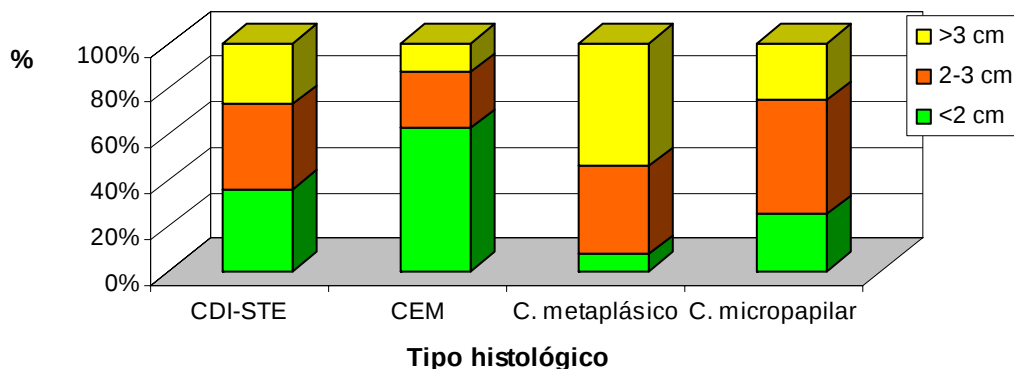


Fig. 34. Dimensão dos carcinomas.

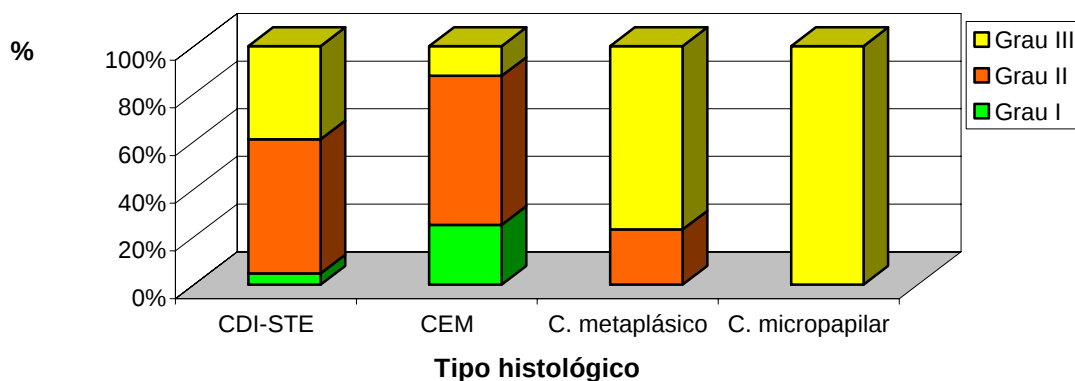


Fig. 35. Grau histológico dos carcinomas.

ÍNDICES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E COMPORTAMENTO BIOLÓGICO

Os carcinomas apresentaram um valor mediano de células em mitose de 1,07% (mínimo 0,10 - máximo 4,56) e de células positivas ao antigénio Ki-67 de 38,54% (variando entre 2,20 e 77,70). Os índices de proliferação dos vários tipos histológicos encontram-se nas figuras 36 e 37 e no quadro 1 do anexo II. Salientaram-se os CEMs e os carcinomas metaplásicos como os menos e os mais proliferativos, respectivamente. O carcinoma papilar *in situ* evidenciou índices mitótico (0,97%) e de Ki-67 (31,9%) relativamente altos.

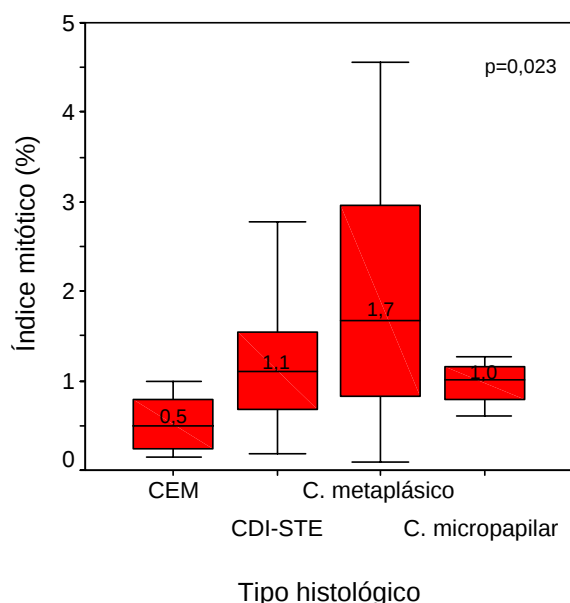


Fig. 36. Variação do índice mitótico nos vários tipos histológicos

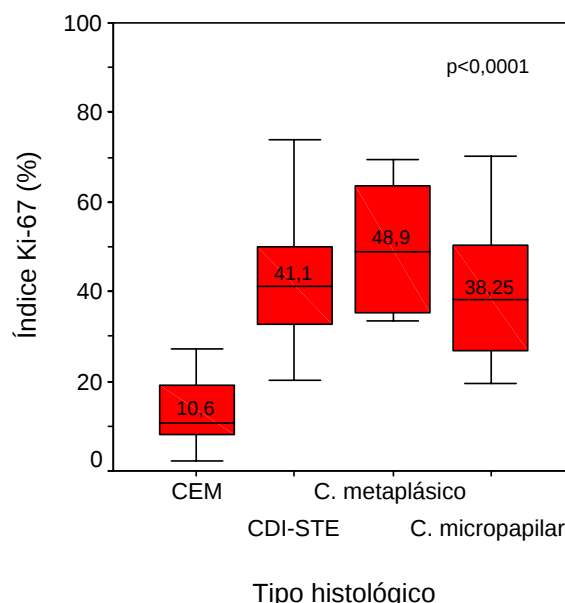


Fig. 37. Variação do índice de Ki-67 nos vários tipos histológicos.

- Associação com os critérios clínico-patológicos

As associações dos índices mitótico e de Ki-67 com os critérios clínico-patológicos e imuno-histoquímicos encontram-se expressas no quadro 2 do anexo II. Os índices mitótico e de Ki-67 associaram-se com a idade ($p=0,008$ e $p=0,025$, respectivamente), o tamanho ($p=0,008$ e $p=0,025$, respectivamente), o grau histológico ($p<0,0001$ e $p=0,001$, respectivamente; fig. 38 e 39), o estadio ($p=0,002$ e $p<0,0001$, respectivamente; figuras 3 e 4 do anexo II), a necrose ($p=0,001$ e $p=0,007$, respectivamente), o padrão de crescimento ($p=0,002$ e $p=0,009$, respectivamente), a diferenciação epidermóide ($p=0,025$ e $p=0,021$, respectivamente), a permeação vascular ($p<0,0001$ e $p<0,0001$, respectivamente), a metastização ganglionar ($p=0,012$ e $p=0,003$, respectivamente), a expressão de MMP1 ($p=0,003$ e $p=0,001$, respectivamente) e de VEGF ($p=0,009$ e $p<0,0001$, respectivamente; figuras 5 e 6 do anexo II). O índice mitótico associou-se ainda com o grau nuclear ($p<0,0001$; figuras 1 do anexo II), a invasão ($p=0,006$) e a expressão de caderina E ($p=0,006$). Todos os carcinomas de grau histológico III, com mais de 3 cm, crescimento infiltrativo, permeação vascular e/ou estadio avançado, evidenciaram proliferação celular alta (fig. 40).

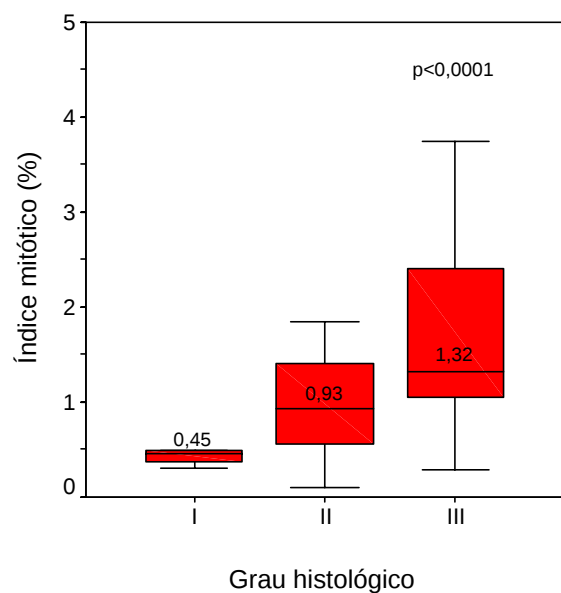


Fig. 38. Variação do índice mitótico com o grau histológico

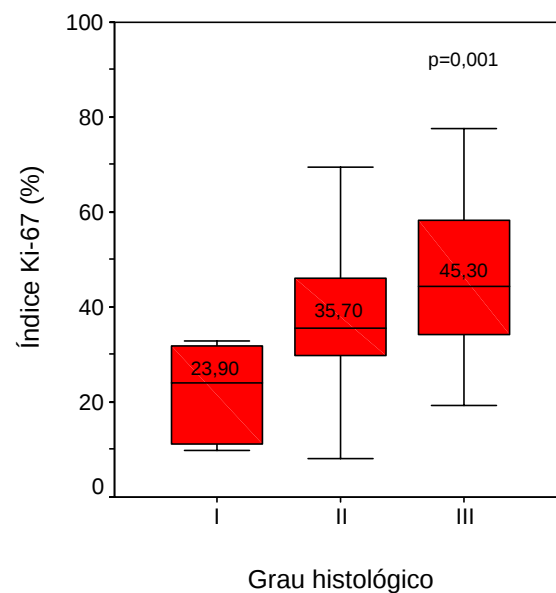


Fig. 39 Variação do índice de antígeno Ki-67 com o grau histológico.

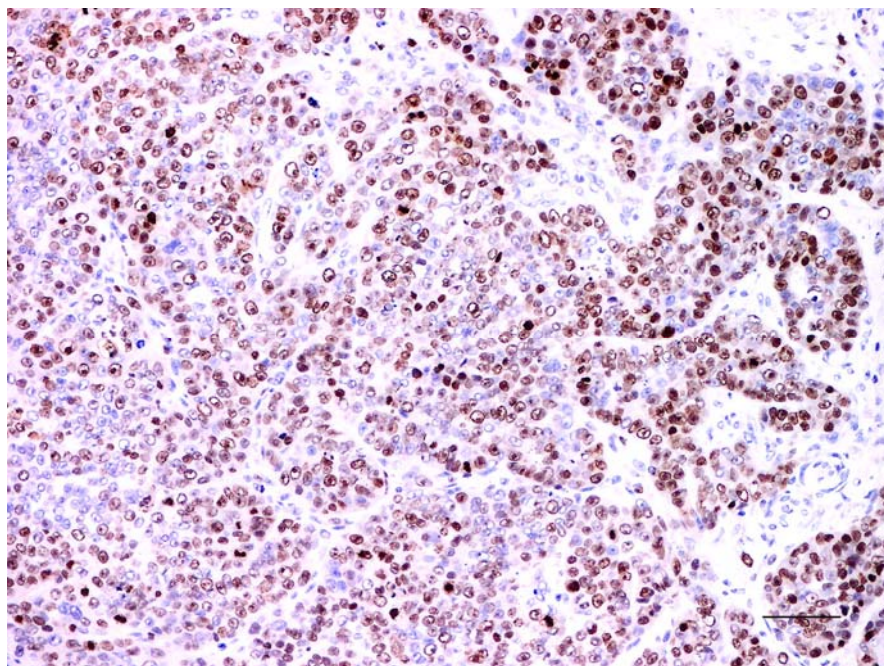


Fig. 40. Positividade ao antígeno Ki-67 num CDI-STE. Estalão = 60 μ m.

CARACTERIZAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

Vimentina, panqueratina e marcadores de diferenciação mioepitelial (CK14, p63 e calponina)

A extensão da imunoreactividade é relativa apenas ao componente epitelial; a expressão no componente mioepitelial foi apenas avaliada como ausente/presente.

Além da expressão no estroma conjuntivo e vasos, foi observada imunoreactividade à **vimentina** em 75% (n=70) dos carcinomas. A expressão foi focal na maioria dos casos (n=35; 37%) mas, 17% (n=16) dos carcinomas evidenciaram expressão difusa. O carcinoma metaplásico foi o tipo tumoral que apresentou com maior frequência expressão difusa (n=4; 31%), enquanto a maioria dos CEMs foi negativa nas células luminais (n=5; 63%), apesar de apresentar positividade constante nas células mioepiteliais. A expressão difusa ocorreu em 14% dos carcinomas de grau II e em 23% dos de grau III mas não foi observada em nenhum carcinoma de grau I; ocorreu principalmente em carcinomas de grau nuclear 3. O carcinoma papilar *in situ* evidenciou positividade focal nas células carcinomatosas.

A **panqueratina** foi utilizada exclusivamente para confirmar as características epiteliais dos carcinomas fusiformes, que evidenciaram positividade focal e ténue, no citoplasma das células tumorais.

A positividade à **CK14** nas células epiteliais foi observada em 71% (n=67) dos carcinomas (fig. 42). Estas células não apresentaram imunoreactividade aos outros marcadores mioepiteliais, confirmando-se o seu fenótipo luminal. Vinte e seis carcinomas (28%), todos de grau II e III, evidenciaram positividade difusa de CK14. A maioria dos carcinomas micropapilares invasores (n=4; 50%) e o componente luminal dos CEMs (n=5; 62,5%) foi negativo à CK14; pelo contrário a maioria dos carcinomas metaplásicos evidenciou expressão difusa (n=6; 50%). O carcinoma papilar *in situ* apresentou positividade focal nas células carcinomatosas.

Foi observada positividade à CK14 nos ninhos de invasão de 64 carcinomas (69%) de todos os tipos histológicos mas, com menor frequência no CEM, tendo sido observada apenas num tumor. Os êmbolos eram também frequentemente positivos.

O componente mioepitelial, quando presente, evidenciou positividade citoplasmática à CK14 e à **calponina**, e nuclear à proteína **p63**. Além da imunoreactividade do mioepitélio da

mama não neoplásica, do carcinoma papilar *in situ*, e dos CEMs, observou-se população mioepitelial remanescente ou hiperplásica em 15 (23%) dos CDI-STE; em 4 casos esta população era numerosa e rodeava ninhos sólidos, estruturas tubulares e papilares mas, nas áreas de invasão, era substituída por células basais, positivas à CK14 e p63 mas negativas à calponina. A imunoreactividade dos CEM e dos carcinomas metaplásicos à vimentina e aos marcadores do fenótipo mioepitelial encontra-se resumida nos quadros 10 e 11 (fig. 41 a 47).

A calponina permitiu ainda evidenciar a existência de miofibroblastos estromais em 89% (n=66) dos carcinomas. Estas células eram positivas à calponina mas negativas à CK14 e p63. Em 43% (n=32) dos casos observou-se ainda imunoreactividade ténue à calponina no citoplasma das células neoplásicas luminiais. As áreas de cartilagem mesenquimatosa apresentaram expressão ténue de calponina e de proteína p63 (fig. 48).

O mioepitélio do carcinoma papilar *in situ* apresentou positividade à vimentina e a todos os marcadores mioepiteliais; observou-se ainda imunoreactividade focal das células luminiais à vimentina e à CK14.

Quadro 10. Imuno-expressão de vimentina e de marcadores de diferenciação basal/mioepitelial nos CEMs.

Caso nº	CEM	Vimentina	CK14	p63	Calponina
1	Epitélio luminal Células basais/mioepiteliais	+ +++	- +++	-* +	- +
2	Epitélio luminal Células basais/mioepiteliais	- +++	- +++	- +/-	- +
3	Epitélio luminal Células basais/mioepiteliais	- +++	- ++	- +	- +
4	Epitélio luminal Células basais/mioepiteliais	- +++	+++ +++	- +	- +
5	Epitélio luminal Células basais/mioepiteliais	++ +++	+++ +++	-* +	- +
6	Epitélio luminal Células basais/mioepiteliais	- +++	- +++	- +/-	- +
7	Epitélio luminal Células basais/mioepiteliais	+ +++	- +++	- +	- +
8	Epitélio luminal Células basais/mioepiteliais	- +++	+++ +++	- +	- +

(*Alteração fibroquística adjacente e áreas focais do tumor com positividade citoplasmática de p63 nas células luminiais).

Quadro 11. Imuno-expressão de vimentina e de marcadores de diferenciação mioepitelial nos carcinomas metaplásicos.

Caso nº	Elemento metaplásico	Vimentina	CK14	p63	Calponina
1	Condróide com áreas epidermóides e fusiformes	+++	+	+	M/CE
2	Condróide com áreas epidermóides	+	++	+	C/MF
3	Condróide com áreas epidermóide	+++	+++	+	C/M/MF
4	Carcinoma fusiforme	+++	-	+	C/MF
5	Carcinoma epidermóide	+	+++	+	C/MF
6	Condróide com áreas epidermóides	++	+	+	C/MF
7	Carcinoma fusiforme	+++	+	+	M/CGM
8	Condróide com áreas mixóides e epidermóide	+	+++	+	C/M/MF
9	Condróide com áreas epidermóides	+	+	-	MF
10	Carcinoma epidermóide	+	+++	+	C/MF
11	Carcinoma epidermóide	+	+++	+	MF
12	Carcinoma epidermóide	+	+++	+	C/MF

(C: carcinoma; CE: carcinoma epidermóide; M: mioepitélio; MF: miofibroblastos; CGM: células gigantes multinucleadas)

Caderina E e β -catenina

A mama não neoplásica adjacente aos carcinomas e a epiderme constituíram um bom controlo interno de positividade, permitindo avaliar a intensidade da imuno-expressão destas moléculas de adesão. A positividade era restrita às junções intercelulares das células epiteliais mas, observou-se também imunorreactividade no endotélio vascular.

A expressão de Caderina E variou com o tumor e dentro da mesma lesão; foi heterogénea, de intensidade fraca a forte (fig. 49), sendo comum observar-se expressão aberrante, no citoplasma. O mesmo se verificou com a β -catenina, onde se observou também expressão aberrante no núcleo (fig. 50). Em 9% (n=7) dos casos para a Caderina E e em 3% (n=2) para a β -Catenina observou-se predomínio de marcação aberrante. O padrão de imuno-expressão das 2 moléculas está sumariado no quadro 12.

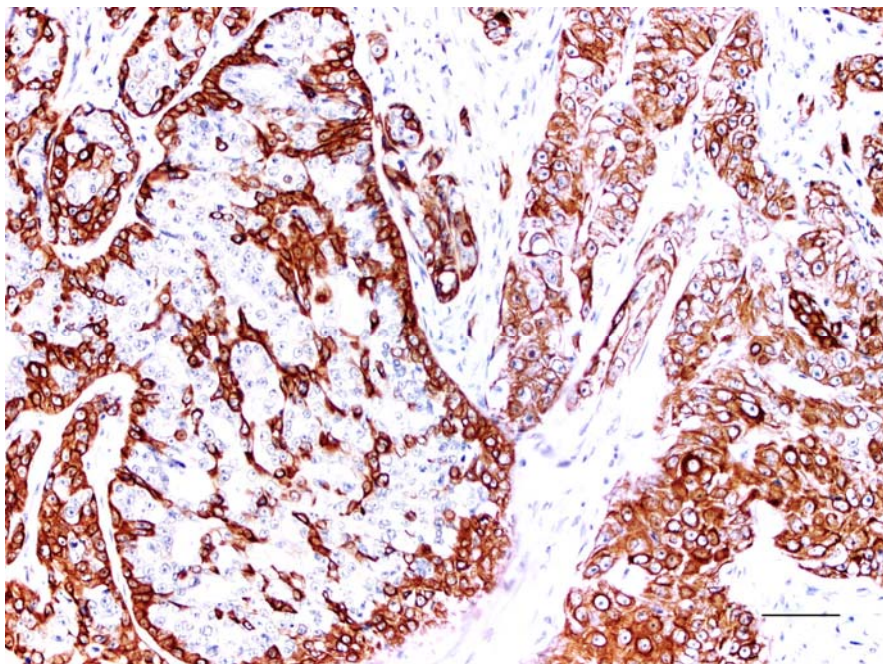


Fig. 41. CDI-STE evidenciando imunopositividade à CK14. Estalão = 60 μ m.

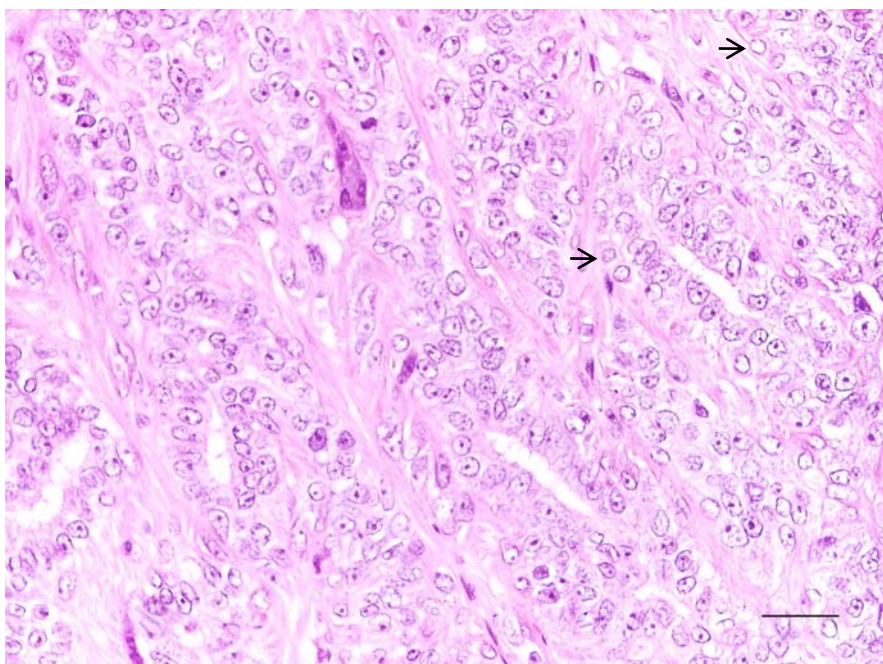


Fig. 42. CEM evidenciando túbulos e cordões celulares rodeados por mioepitélio ($\Rightarrow$) e células gigantes multinucleadas de tipo osteoclasto. Estalão = 30 μ m.

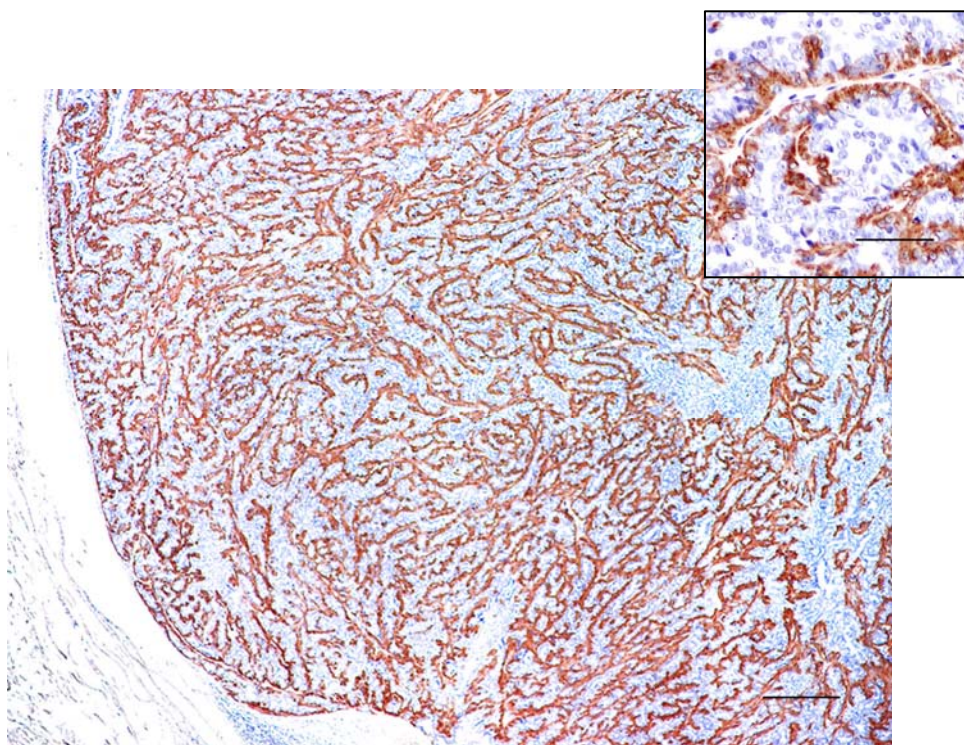


Fig. 43. CEM evidenciando limite expansivo e extensa positividade à CK14. Estalão = 300 μ m. Estalão insert = 60 μ m.

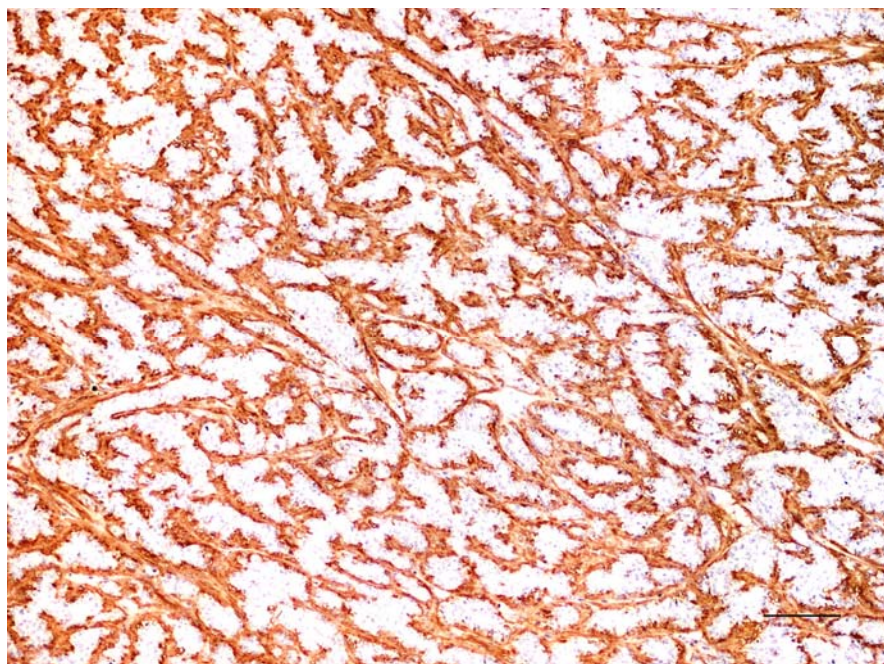


Fig. 44. CEM evidenciando intensa positividade à calponina. Estalão = 120 μ m.

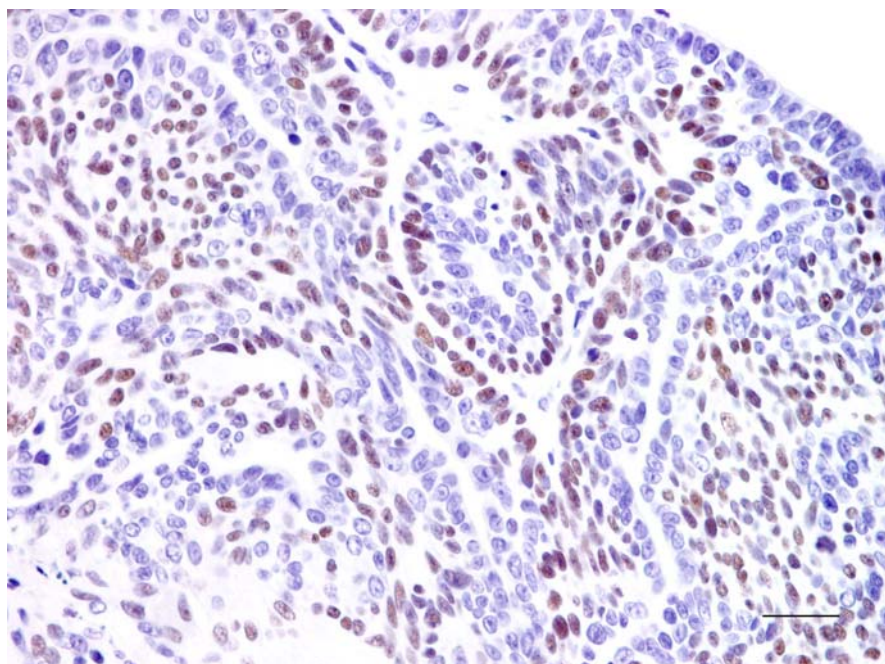


Fig. 45. CEM evidenciando positividade basal/mioepitelial à proteína p63. Estalão = 30 μ m.

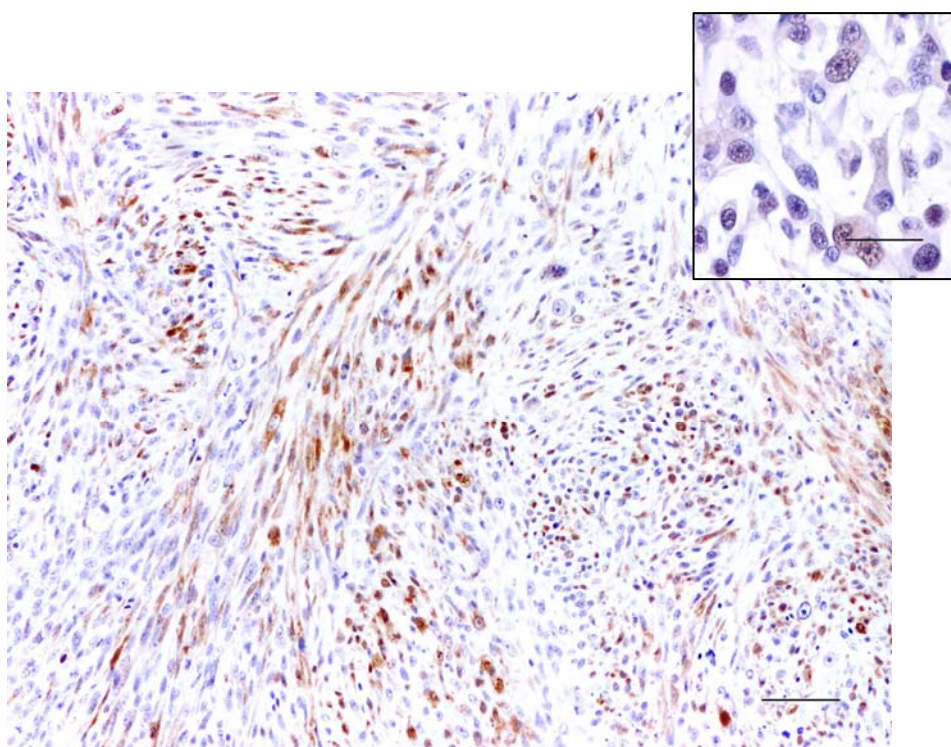


Fig. 46. Carcinoma de células fusiformes evidenciando positividade à calponina. Estalão = 60 μ m. Insert evidencia positividade de algumas células à proteína p63. Estalão insert = 20 μ m.

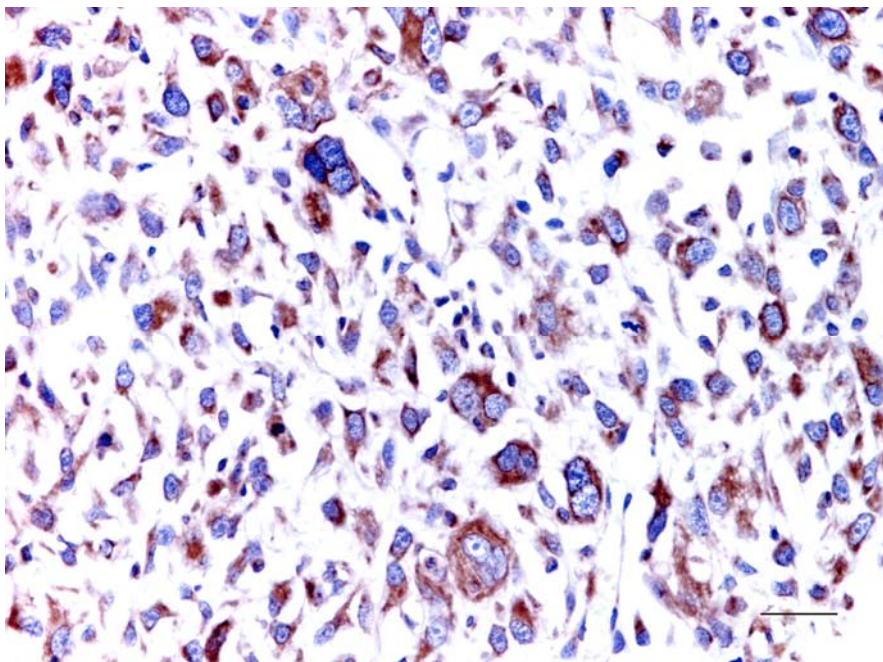


Fig. 47. Carcinoma de células fusiformes apresentando forte positividade à vimentina. Estalão = 50 μ m.

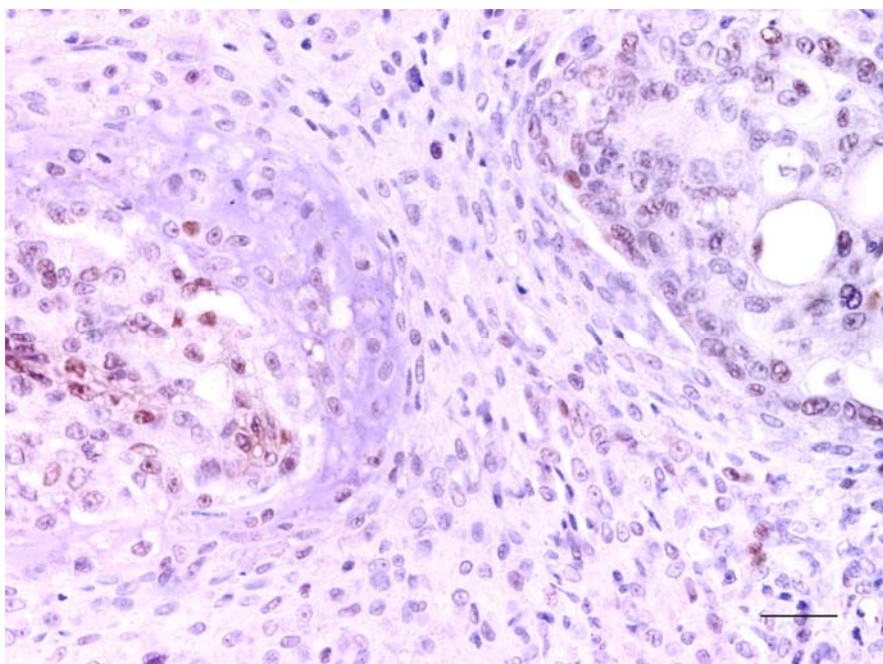


Fig. 48. Carcinoma metaplásico apresentando células positivas à proteína p63 no componente epitelial, na cartilagem e no estroma. Estalão = 30 μ m.

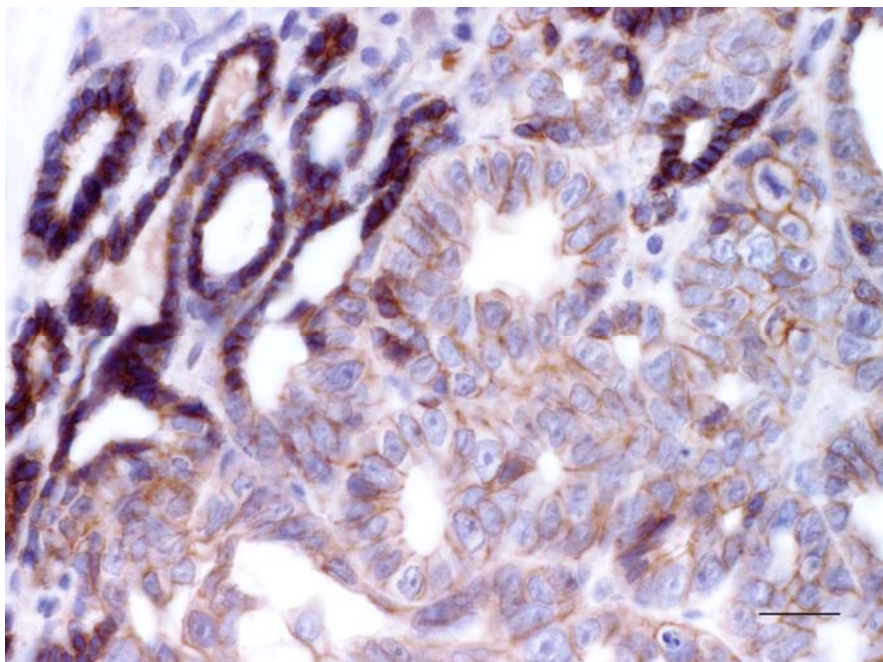


Fig. 49. CDI-STE apresentando diminuição da expressão de caderina E relativamente ao tecido não neoplásico. Estalão = 20 μ m.

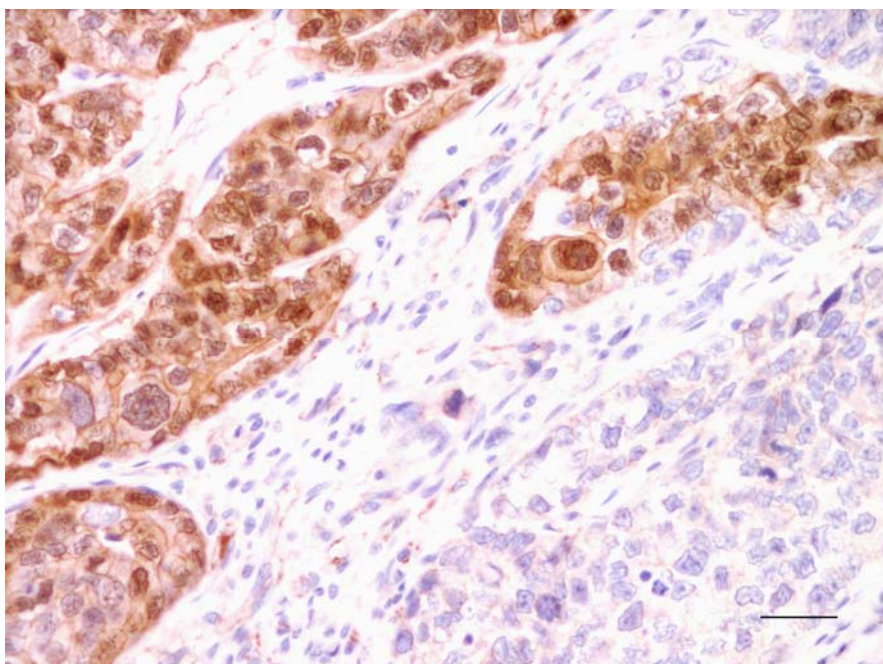


Fig. 50. CDI-STE evidenciando expressão diminuída e aberrante de β -catenina. Estalão = 30 μ m.

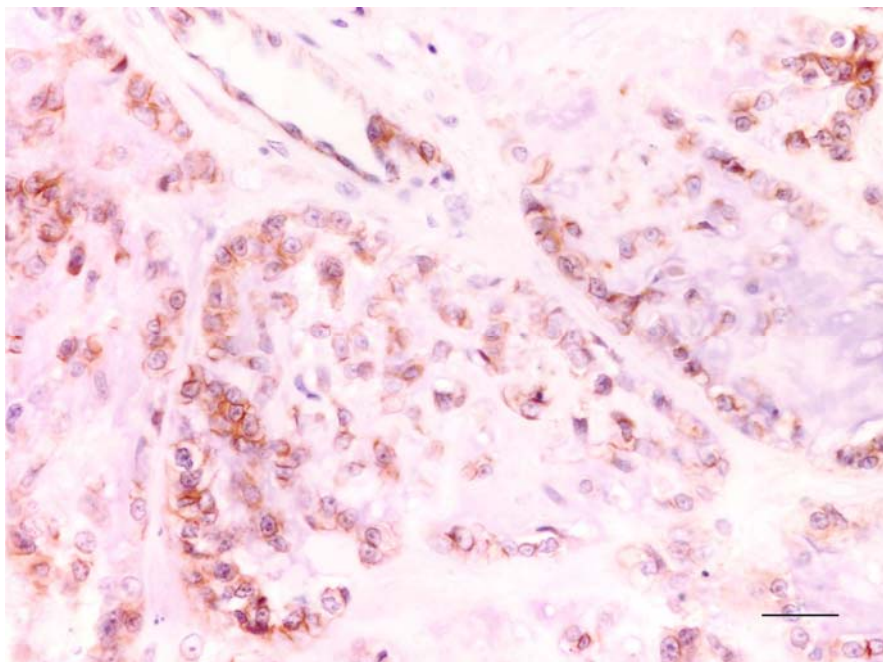


Fig. 51. Expressão de β -catenina num carcinoma metaplásico. Estalão = 30 μ m.

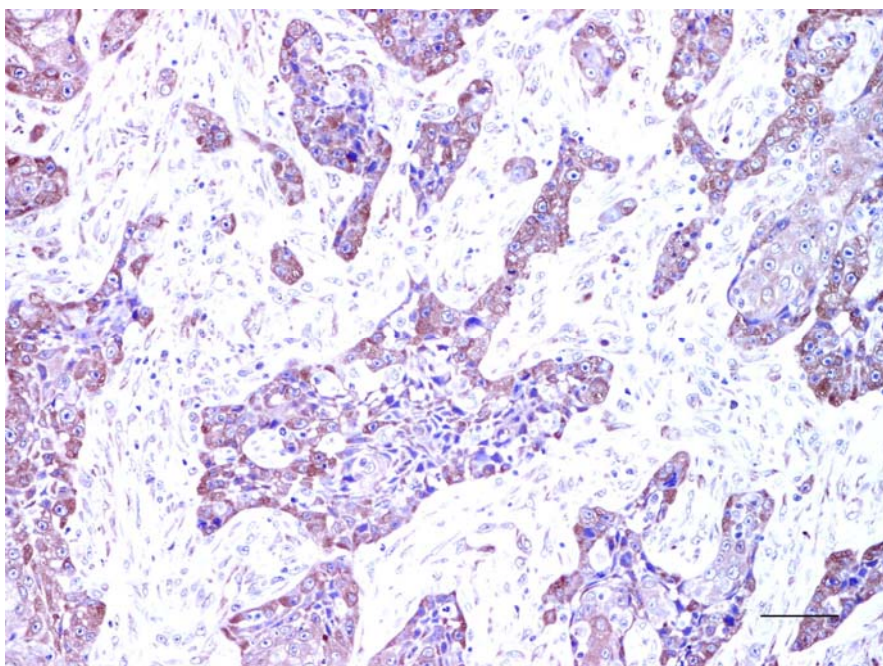


Fig. 52. CDI-STE evidenciando extensa imunorreatividade à MMP1. Estalão = 60 μ m.

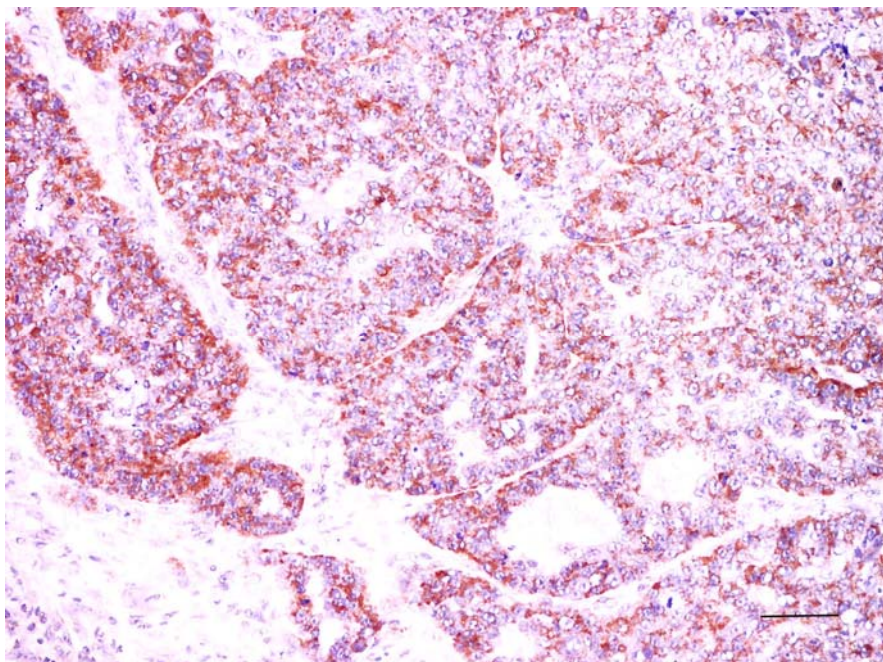


Fig. 53. CDI-STE evidenciando extensa imunorreatividade à MMP2.
Estalão = 60 μ m.

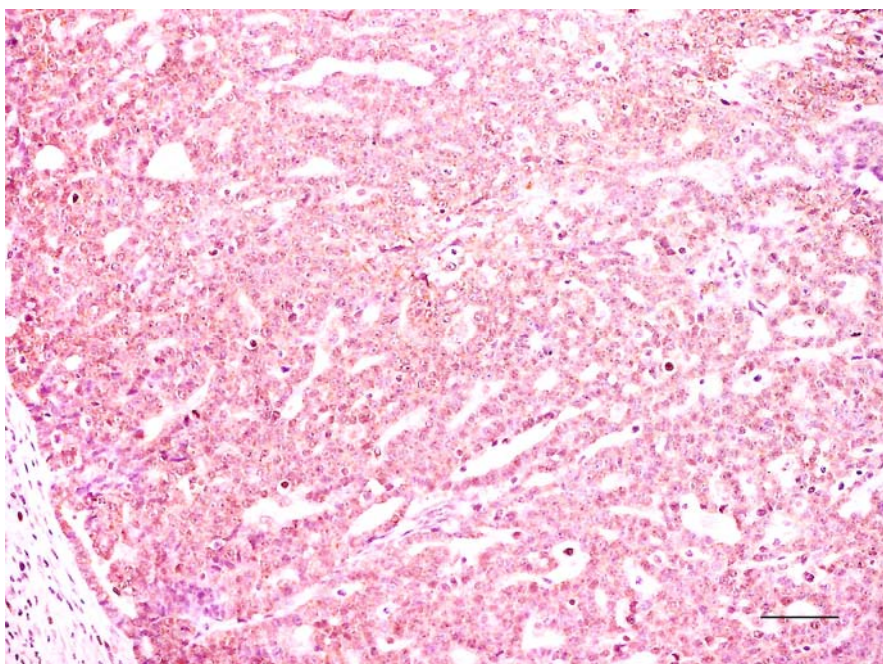


Fig. 54. CDI-STE evidenciando extensa imunorreatividade de TIMP1.
Estalão = 60 μ m.

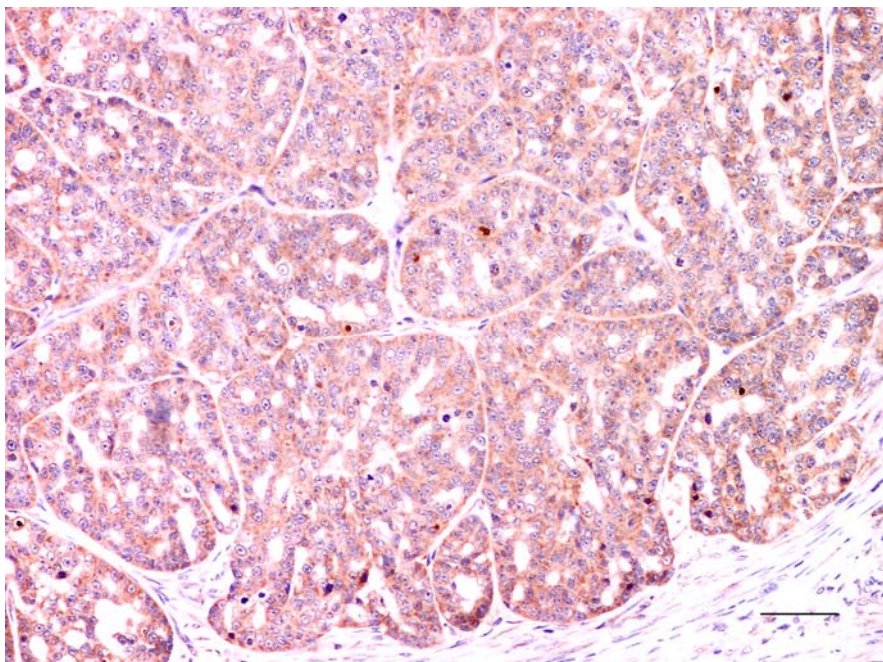


Fig. 55. CDI-STE evidenciando extensa imunoreatividade ao VEGF
Estalão = 60 μ m.

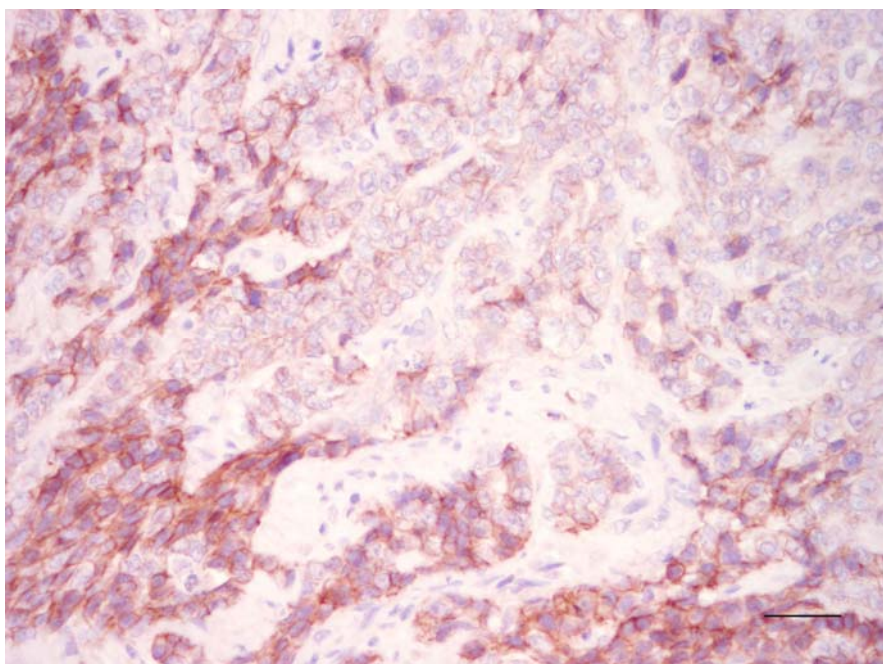


Fig. 56. Carcinoma evidenciando áreas de expressão de HER-2/*neu* com
intensidade forte (2+) Estalão = 30 μ m.

Quadro 12. Imuno-expressão de Caderina E e β -catenina.

Imuno-expressão	Fenótipo			Expressão	
	Reduzido n (%)		Preservado n (%)	Membranar n (%)	Aberrante n (%)
	<25%	25-75%			
Caderina E	12 (12,9)	55 (59,1)	26 (28,0)	18 (19,4)	75 (80,6)
β -Catenina	8 (8,6)	56 (60,2)	29 (31,2)	51 (54,8)	42 (45,2)

As associações entre o padrão de expressão (fenótipo) de Caderina E e β -catenina, e os critérios clínico-patológicas estão presentes no quadro 13.

Apenas vinte e seis carcinomas (28,0%) evidenciaram fenótipo preservado de Caderina E. O padrão de imuno-expressão de caderina E associou-se com o grau histológico ($p=0,002$) observando-se um aumento significativo do número de carcinomas com fenótipo reduzido do grau II ($n=24$; 54,5%) para o grau III ($n=39$; 88,6%). Observaram-se também associações com a extensão da invasão. Em relação ao tipo histológico, observou-se a tendência dos CEMs apresentarem fenótipo preservado (62,5%; 5/8) enquanto os outros tipos histológicos evidenciaram fenótipo reduzido; salientaram-se os carcinomas metaplásico e micropapilar com expressão diminuída em 91,7% (11/12) e 75% (6/8) dos casos, respectivamente, e com extensa marcação aberrante.

Observou-se ainda a tendência do aparecimento do fenótipo diminuído com o aumento do tamanho da neoplasia e do estadio, em particular do estadio 1 para o 2. A maioria dos carcinomas com êmbolos e/ou metástases evidenciava fenótipo diminuído.

Relativamente à β -Catenina 29 carcinomas (31,2%) evidenciaram fenótipo preservado. Quando comparámos o padrão de imuno-expressão com o tipo histológico, verificámos novamente uma maior frequência de fenótipo preservado nos CEMs (75%; 6/8) ($p=0,03$). Observámos também tendência ao aumento do fenótipo diminuído com o aumento do grau histológico, do tamanho e da extensão da invasão.

O carcinoma papilar *in situ* evidenciou fenótipo preservado de ambas as moléculas de adesão, apesar de apresentar expressão citoplasmática aberrante

O padrão de imuno-expressão de caderina E estava correlacionado com o padrão de expressão da β -Catenina ($p<0,0001$) (quadro 14). Dos 64 carcinomas com fenótipo reduzido de β -Catenina, 56 também evidenciavam fenótipo reduzido de Caderina E.

Quadro 13. Associação do fenótipo reduzido e preservado de Caderina E e β -catenina e da relação Caderina E/ β -Catenina com os critérios clínico-patológicos clássicos.

	Caderina E		β -Catenina		Caderina E/ β -Catenina	
	Diminuído n (%)	Preservado n (%)	Diminuído n (%)	Preservado n (%)	Diminuído n (%)	Preservado n (%)
Tipo histológico						
CDI-STE	47 (70,1)	18 (62,9)	47 (73,4)	18 (62,1)	55 (73,3)	10 (55,6)
CEM	3 (4,5)	5 (19,2)	2 (3,1)	6 (20,7)	3 (4,0)	5 (27,8)
C. metaplásico	11 (16,2)	1 (3,8)	10 (15,6)	2 (6,9)	11 (14,7)	1 (5,9)
C. micropapilar	6 (9,0)	2 (7,7)	5 (7,8)	3 (10,3)	6 (8,0)	2 (11,1)
	p=0,07		p=0,03		p=0,01	
Tamanho (cm)						
<2	18 (26,9)	13 (50,0)	18 (28,12)	13 (44,8)	23 (30,7)	8 (44,4)
2-3	26 (38,8)	9 (34,6)	23 (35,9)	12 (41,4)	29 (38,7)	6 (33,3)
>3	23 (34,3)	4 (15,4)	23 (35,9)	4 (13,8)	23 (30,7)	4 (22,2)
	p=0,07		p=0,07		p=0,52	
Grau histológico						
Grau I	4 (6,0)	1 (3,8)	3 (4,7)	2 (6,9)	4 (5,3)	1 (5,6)
Grau II	24 (35,8)	20 (76,9)	28 (43,8)	16 (55,2)	31 (41,38)	13 (72,2)
Grau III	39 (58,2)	5 (19,2)	33 (51,6)	11 (37,9)	40 (53,3)	4 (22,2)
	p=0,002		p=0,47		p=0,05	
Grau nuclear						
Grau 2	24 (35,8)	15 (55,7)	23 (35,9)	16 (55,2)	28 (37,5)	11 (61,1)
Grau 3	43 (64,2)	11 (42,3)	41 (64,1)	13 (44,8)	47 (62,7)	7 (38,9)
	p=0,065		p=0,12		p=0,11	
Estadio						
I	16 (23,9)	11 (42,3)	16 (25,0)	11 (37,9)	21 (28,0)	6 (33,3)
II	20 (29,9)	5 (19,2)	18 (28,1)	7 (24,1)	22 (29,3)	3 (16,7)
III/IV	31 (46,3)	10 (38,5)	30 (46,9)	11 (37,9)	32 (42,7)	9 (50,0)
	p=0,20		p=0,44		p=0,55	
Invasão						
Ausente	0 (0,0)	1 (3,8)	0 (0,0)	1 (3,4)	0 (0,0)	1 (5,6)
Estroma	39 (58,2)	20 (76,9)	38 (59,4)	21 (72,4)	44 (58,7)	15 (83,3)
Muscular	28 (41,8)	5 (19,2)	26 (40,6)	7 (24,1)	31 (41,3)	2 (11,1)
	p=0,04		p=0,12		p=0,01	
Permeação vascular						
Ausente	20 (29,9)	9 (34,6)	19 (29,7)	10 (34,5)	24 (32,0)	5 (27,8)
Presente	47 (70,1)	17 (65,4)	45 (70,3)	19 (65,5)	51 (68,0)	13 (72,2)
	p=0,80		p=0,64		p=1,00	
Metástase ganglionares (N)						
N0	52 (77,6)	19 (73,1)	50 (78,1)	21 (72,4)	59 (78,7)	12 (66,7)
N1	15 (22,4)	7 (26,9)	14 (21,9)	8 (27,6)	16 (21,3)	6 (33,3)
	p=0,79		p=0,60		p=0,36	

Quadro 14. Correlação do padrão de expressão de Caderina E e β -Catenina.

	n	β -Catenina n (%)		p
		Diminuída	Preservada	
Caderina E				
Preservada	26	8 (12,3)	18 (62,1)	<0,0001
Diminuída	67	56 (83,6)	11 (37,9)	
Total	93	64	29	

Analísamos também a expressão de Caderina E e β -Catenina em simultâneo. O fenótipo preservado Caderina E/ β -Catenina inclui os casos em que ambas as proteínas evidenciavam expressão preservada, o que ocorreu em apenas 19% dos carcinomas invasores. O fenótipo era reduzido quando pelo menos uma das proteínas tinha expressão reduzida.

- Associação com os critérios clínico-patológicos

A relação Caderina E/ β -catenina associou-se com o tipo histológico ($p=0,01$): 62,5 % (5/8) dos CEMs evidenciam fenótipo preservado de ambas as moléculas, enquanto 15,4% (10/65) dos CDI-STE, 8,3% (1/12) dos carcinomas metaplásicos e 25% (2/8) dos micropapilares evidenciaram fenótipo reduzido. Observámos também diminuição do fenótipo preservado com aumento do grau histológico (em particular no grau III) ($p=0,05$), do tamanho da lesão e da extensão da invasão ($p=0,01$). A maioria dos carcinomas com invasão da camada muscular (94%; 31/33), com permeação vascular (80%; 51/64) e com metástases ganglionares (73%; 16/22) evidenciou fenótipo reduzido.

Metaloproteinase da matriz 1 (MMP1), MMP2 e inibidor das metaloproteinases da matriz 1 (TIMP1)

A maioria dos carcinomas apresentou imunopositividade difusa às duas metaloproteinases, de intensidade moderada a forte. Além da positividade nas células neoplásicas, observou-se marcação em CGM, fibroblastos, êmbolos e metástases. A imunorreactividade era mais intensa nos ninhos invasores e menos intensa na mama não neoplásica. Os carcinomas metaplásicos apresentaram positividade nas áreas fusiformes, condróides e epidermóides e, nos CEMs observou-se expressão nas células mioepiteliais.

Foi observada sobre-expressão de MMP1 em 71% ($n=67$) dos carcinomas (fig 53) e de MMP2 em 79% ($n=79$) (fig 54). A maioria dos carcinomas evidenciou sobre-expressão das duas metaloproteinases, com excepção dos CEMs que evidenciaram expressão aumentada de MMP2 mas baixa de MMP1. Salientaram-se os carcinomas micropapilares invasores com sobre-expressão de MMP1 e de MMP2 na totalidade da série.

Em relação ao TIMP1, 47% ($n=44$) dos carcinomas exibiram sobre-expressão, que foi mais frequente em carcinomas metaplásicos e micropapilares e menos frequente nos CEMs. O carcinoma papilar *in situ* evidenciou expressão elevada de MMP1, mas baixa de MMP2 e TIMP.

- Associação com os critérios clínico-patológicos

As associações de MMP1, MMP2 e TIMP1 com os critérios clínico-patológicos e imuno-histoquímicos encontram-se nos quadros 1 e 2 do anexo III.

A sobre-expressão de **MMP1** associou-se com a ulceração ($p=0,0047$) e o grau histológico ($p=0,004$), observando-se um aumento progressivo da expressão de MMP1 dos

carcinomas grau I (1/5; 20%), para os de grau II (28/44; 64%) e III (37/44; 84%). A sobre-expressão ocorreu principalmente em carcinomas de grau nuclear 3 ($p=0,01$), com necrose extensa ($p=0,03$) mas não se associou com o estadio nem com a invasão. Observaram-se ainda fortes associações estatísticas com a permeação vascular ($p<0,0001$), a diferenciação epidermóide ($p=0,002$), e com os índices mitótico ($p=0,004$) e de Ki-67 ($p=0,001$). Apesar de não significativo verificámos ainda que a maioria dos carcinomas com invasão da camada muscular (25/33) ou com metastização ganglionar (18/22) apresentou expressão alta de MMP1.

A expressão de **MMP2** associou-se de forma significativa com a permeação vascular ($p=0,04$), a diferenciação epidermóide ($p=0,01$), o índice de VEGF ($p=0,019$) e de TIMP ($p=0,03$). A sobre-expressão de MMP2 foi mais evidente nos tumores de grau e estadio elevados. A sobre-expressão de **TIMP1** relacionou-se de forma significativa com a abundância do infiltrado inflamatório ($p=0,008$) e com a expressão de MMP2 ($p=0,004$) e VEGF ($p=0,03$).

VEGF

A expressão de VEGF ocorreu no citoplasma das células sob a forma granular e/ou difusa. Observou-se imunorreactividade nas células epiteliais luminais não neoplásicas e neoplásicas, em fibroblastos estromais, células endoteliais e células inflamatórias, particularmente em macrófagos. As células invasoras, êmbolos vasculares e as metástases foram também positivas. A maioria dos carcinomas evidenciou índice de VEGF alto, observando-se um aumento da expressão em células invasoras e na proximidade das áreas de necrose. Salientaram-se os CEMs com os índices de VEGF mais baixos ($n=5$; 62,5%), e os carcinomas metaplásicos, com índice alto na totalidade da série ($p=0,01$) (Fig. 57). O carcinoma papilar *in situ* apresentou também índice de VEGF alto.

- Associação com os critérios clínico-patológicos

As associações do VEGF e os critérios clínico-patológicos encontram-se nos quadros 3 e 4 do anexo III.

O índice de VEGF associou-se com o grau histológico ($p=0,001$), o grau nuclear ($p=0,02$), o estadio ($p=0,001$), o índice mitótico ($p=0,009$) e de Ki-67 ($p<0,0001$), a diferenciação epidermóide ($p=0,01$), a permeação vascular ($p=0,001$), a metastização

ganglionar ($p=0,003$), os índices de MMP2 ($p=0,019$) e TIMP1 ($p=0,04$). A expressão alta de VEGF ocorreu principalmente em carcinomas infiltrativos.

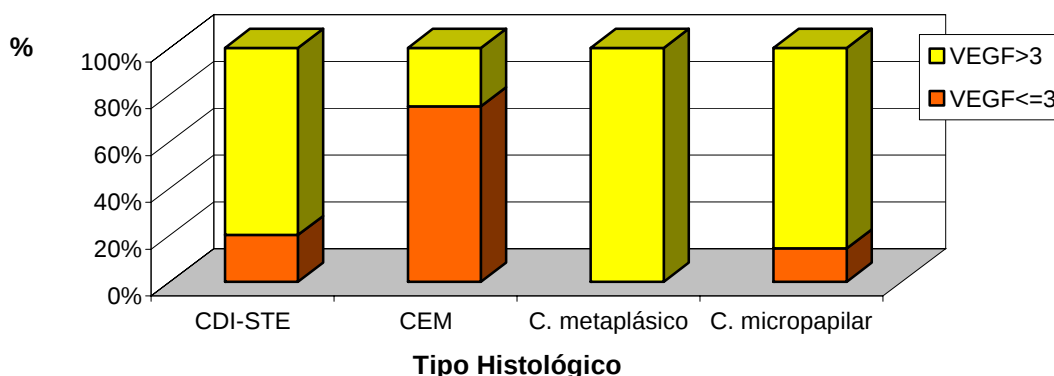


Fig. 57. Índice de VEGF nos vários tipos histológicos ($p=0,01$).

HER-2/neu

Dezassete carcinomas foram positivos ao HER-2/neu. A positividade membranar foi observada de forma focal e pouco extensa (fig. 56), com predomínio da expressão no citoplasma das células neoplásicas (61/94), que é considerada negativa (quadro 15).

Quadro 15. Associação da expressão de HER-2/neu com o tipo histológico ($p=0,05$).

Tipo histológico	HER-2 negativo		HER-2 positivo	
	Citoplasma	1+	2+	3+
Carcinoma papilar <i>in situ</i>	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
CDI-STE	42 (64,6)	11 (16,9)	12 (18,2)	0 (0,0)
CEM	7 (87,5)	1 (12,5)	0 (0,0)	0 (0,0)
C. metaplásico	9 (75,0)	2 (16,7)	0 (0,0)	1 (8,3)
C. micropapilar	2 (25,0)	2 (25,0)	4 (50,0)	0 (0,0)
Total	61 (65,0)	16 (17,0)	16 (17,0)	1 (1,0)

O carcinoma micropapilar foi o tipo histológico mais frequentemente positivo ao HER-2 e salienta-se ainda a baixa positividade dos carcinomas metaplásicos; todos os CEMs foram negativos.

Associação com os critérios clínico-patológicos

As associações da expressão de HER-2/neu e os critérios analisados encontram-se nos quadros 16 e 17.

Quadro 16. Associação da expressão de HER-2/*neu* e as variáveis clínico-patológicas e imuno-histoquímicas.

Parâmetro	HER-2/ <i>neu</i>		p
	Negativo n (%)	Positivo n (%)	
Tamanho (cm)			
<2	25 (32,9)	6 (35,3)	0,86
2-3	28 (36,8)	7 (41,2)	
>3	23 (30,3)	4 (23,5)	
Ulceração			
Ausente	52 (68,4)	12 (70,6)	1,00
Presente	24 (31,6)	5 (29,4)	
Necrose			
Ausente	4 (5,3)	1 (5,9)	0,90
Células isoladas	7 (9,2)	1 (5,9)	
Extensa	65 (85,5)	15 (88,2)	
Grau histológico			
Grau I	5 (6,6)	0 (0,0)	0,40
Grau II	37 (48,7)	7 (41,2)	
Grau III	34 (44,7)	10 (58,8)	
Grau nuclear			
Grau 2	33 (43,4)	6 (35,3)	0,60
Grau 3	43 (56,6)	11 (64,7)	
Estadio			
I	25 (32,9)	2 (11,8)	0,20
II	19 (25,0)	6 (35,3)	
III/IV	32 (42,1)	9 (52,9)	
Invasão			
Ausente	1 (1,3)	0 (0,0)	0,45
Estroma	46 (60,5)	13 (76,5)	
Muscular	29 (38,2)	4 (23,5)	
Padrão de crescimento			
Expansivo	26 (34,2)	7 (41,2)	0,60
Infiltrativo	50 (65,8)	10 (58,8)	
Permeação vascular			
Ausente	26 (34,2)	3 (17,6)	0,25
Presente	50 (65,8)	14 (83,4)	
Metastização ganglionar (N)			
N0	59 (77,6)	12 (70,6)	0,50
N1	17 (22,4)	5 (29,4)	
Caderina E			
Preservada	20 (26,3)	6 (35,3)	0,55
Diminuída	56 (73,7)	11 (64,7)	
β-catenina			
Preservada	23 (30,3)	6 (35,3)	0,77
Diminuída	53 (69,7)	11 (64,7)	
MMP1			
Baixo	24 (31,6)	3 (17,6)	0,37
Alto	52 (68,4)	14 (82,4)	
MMP2			
Baixo	10 (13,2)	2 (11,8)	1,00
Alto	66 (86,8)	15 (88,2)	
TIMP1			
Baixo	39 (51,3)	10 (55,8)	0,60
Alto	37 (48,7)	7 (41,2)	
VEGF			
≤ 3	18 (23,7)	2 (11,8)	0,35
> 3	58 (76,3)	15 (88,2)	

A expressão de HER-2 não se associou de forma significativa com nenhum dos parâmetros analisados. Contudo, verifica-se uma clara tendência dos carcinomas HER-2 positivos a apresentarem necrose extensa, grau nuclear 3, diferenciação epidermóide, permeação vascular e estadio avançado. Estes tumores também evidenciaram com frequência fenótipo diminuído e aberrante de Caderina E e β -Catenina, e sobre-expressão de MMP1, MMP2 e VEGF.

O índice de Ki-67 dos carcinomas positivos ao HER-2/*neu* sugere que estes são mais proliferativos.

Quadro 17: Associação da expressão de HER-2/*neu* e os índices de proliferação.

Parâmetro	HER-2/ <i>neu</i>		p
	Negativo n (%)	Positivo n (%)	
Índice mitótico			
Mediana	1,09	1,05	0,78
Mínimo-Máximo	0,1-4,56	0,29-3,69	
Índice Ki-67			
Mediana	36,45	46,70	0,13
Mínimo-Máximo	2,2-76,6	19,4-77,7	

Receptores de Estrogénio e Progesterona

Foram efectuados estudos dos receptores hormonais utilizando vários anticorpos e várias técnicas (tratamento térmico com microondas, com panela de pressão, tratamento enzimático, incubação durante a noite a várias temperaturas 4°C, 18°C e 26°C). Mas, apesar de alguns anticorpos apresentarem imunorreactividade em tecido de canídeo, nos felinos os resultados não foram constantes nem consistentes, quer na mama, quer no útero (usado como controlo positivo de espécie), razão pela qual não se apresentam quaisquer resultados.

1.2. ESTUDO COMPARATIVO ENTRE CARCINOMAS COM (N_1) E SEM ENVOLVIMENTO GANGLIONAR (N_0)

No quadro 1 e 2 do anexo IV encontram-se sumariadas as associações entre carcinomas N_0 e N_1 e os critérios clínico-patológicos e imuno-histoquímicos. Da sua análise verificámos que as metástases surgiram principalmente em gatas de idade avançada ($p=0,008$), com carcinomas de grau histológico e nuclear altos, estadios avançados ($p<0,0001$), índices mitóticos e de Ki-67 altos ($p=0,012$ e $p=0,003$, respectivamente) (fig. 58 e 59), expressão aberrante das moléculas de adesão e sobre-expressão de MMP1, MMP2 e de VEGF ($p=0,003$) (fig. 60).

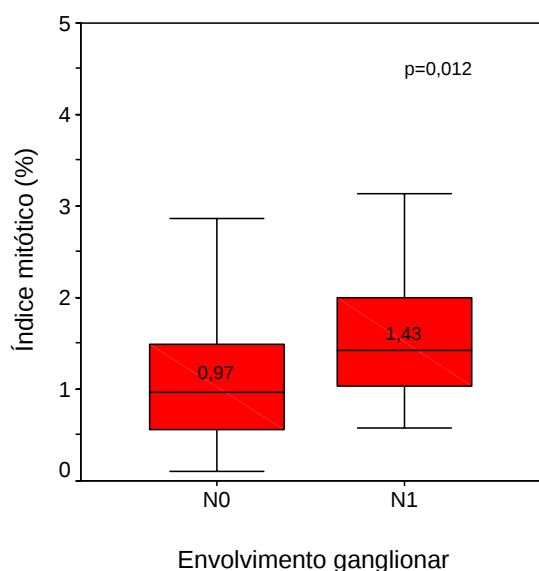


Fig. 58. Comparação do índice mitótico dos carcinomas N_0 e N_1 .

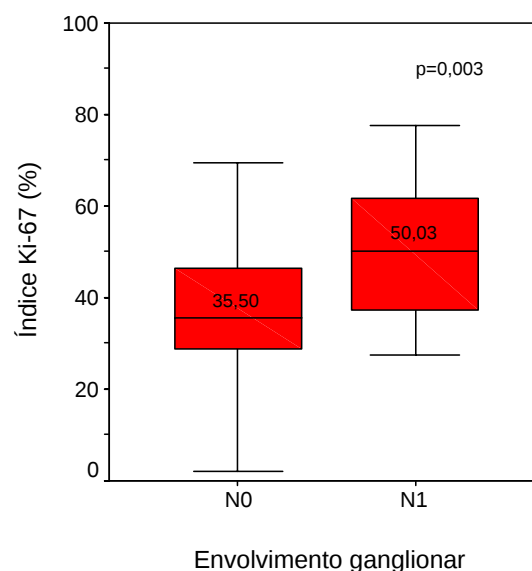


Fig. 59. Comparação do índice de Ki-67 dos carcinomas N_0 e N_1 .

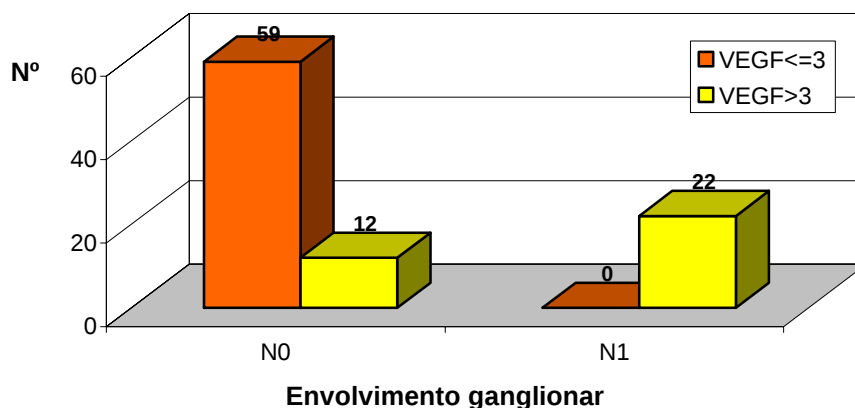


Fig. 60. Expressão de VEGF em carcinomas N_0 e N_1 .

1.3. ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS CARCINOMAS E AS SUAS METÁSTASES

Como referido previamente, na altura da exérese 22 (23%) carcinomas evidenciavam metástases nos gânglios linfáticos regionais. Estas apresentaram em média 1,1 cm de diâmetro (mínimo 0,4 cm; máximo 2,5 cm) e mantiveram, na maioria dos casos, o padrão arquitetural do tumor primário. Contudo, como referido para os tumores primários, observou-se frequentemente a coexistência de vários padrões arquiteturais. Os padrões mais frequentes foram o sólido e padrões relacionados, como o cribriforme e o micropapilar, e os menos observados foram o papilar (1/22) e o tubular (2/22) e sempre em extensão limitada.

A maioria dos tumores metastásicos era CDI-STE (n=14). Contudo, quando avaliamos o valor percentual dentro de cada tipo histológico verificámos que 41,7% dos carcinomas metaplásicos (5/12) e 25% dos micropapilares (2/6) apresentavam metástases ganglionares mas, apenas 12,5% dos CEM tinham metastizado (1/8). A maioria dos carcinomas era de grau histológico III (n=14; 64%) e de grau nuclear 3 (n=15; 68%).

As metástases mantiveram, maioritariamente, o grau nuclear do tumor primário mas, 6 casos (27%) evidenciaram aumento da atipia nuclear e, um caso (4,5%) apresentou grau nuclear inferior. O grau nuclear 3 foi observado em 91% (n=20) das metástases analisadas.

ÍNDICES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E COMPORTAMENTO BIOLÓGICO

À semelhança dos tumores primários, as metástases apresentaram índices de proliferação elevados, não se observando diferenças significativas, como se verifica no quadro 18.

Quadro 18. Comparação dos índices de proliferação de tumores primários e secundários.

	Índice mitótico		Índice de Ki-67	
	Tumor primário	Metástase	Tumor primário	Metástase
Mediana	1,43	1,40	50,03	54,30
Mínimo-Máximo	0,57-3,75	0,27-2,96	27,30-77,70	17,90-83,80
p	0,80		0,70	

EXPRESSÃO DOS MARCADORES IMUNO-HISTOQUÍMICOS

As associações das variáveis clínico-patológicas e imuno-histoquímicas entre os tumores primários e as metástases encontram-se expressas nos quadros 1 e 2 no anexo V.

Vimentina e CK14

Em 82% (n=18) dos tumores primários observou-se expressão de vimentina, que foi difusa em 18,2% (n=4) dos casos. As metástases evidenciaram diminuição do número de casos positivos (n=15; 68%), em particular dos casos com expressão difusa (n=3; 13,6%). Relativamente à CK14, ocorreu expressão em 77% (n=17) dos tumores primários, que foi difusa em 23% (n=5) dos casos. O número de metástases com expressão diminuiu (n=13; 59%) mas aumentaram os casos com positividade difusa (n=7; 32%).

Caderina E e Beta Catenina

A maioria (n=15; 68,2%) dos tumores primários e das metástases (n=14; 63,6%) evidenciou fenótipo diminuído de Caderina E. Em relação à β -catenina observou-se um aumento do número de casos com fenótipo diminuído nas metástases (n=16; 72,7%), relativamente ao tumor primário (n=14; 63,6%). Contudo, a relação entre a expressão de Caderina E e β -catenina foi mantida ($p < 0,0001$): a maioria dos casos com diminuição da expressão de Caderina E também evidenciou diminuição de β -catenina (quadro 2 do anexo IV). Quando comparámos a expressão das duas moléculas em simultâneo, verificámos que apenas uma pequena fracção de carcinomas primários e das metástases evidenciavam fenótipo preservado de Caderina E/ β -catenina.

MMP1, MMP2 e TIMP e VEGF

A maioria dos tumores primários e das metástases evidenciou índices altos destes marcadores.

HER-2/neu

Apenas 5 dos carcinomas metastásicos evidenciaram positividade ao HER-2: quatro eram CDI-STE, e um era micropapilar invasor.

Apenas 3 metástases eram HER-2/neu positivas: 2 tiveram origem em tumores primários positivos e a terceira, teve origem num carcinoma negativo.

2. OUTRAS PROLIFERAÇÕES E LESÕES MAMÁRIAS OBSERVADAS

2.1 ALTERAÇÕES PROLIFERATIVAS NÃO NEOPLÁSICAS

Estas alterações corresponderam a 18% (n=23) dos casos em estudo.

Alteração fibroquística (AFQ)

Estas alterações fibroquísticas corresponderam a 5% (n=6) da totalidade da série avaliada. À observação macroscópica eram massas multinodulares, de aspecto esponjoso, constituídas por cavidades quísticas, de dimensões variáveis e parede fina, contendo fluido seroso ou gelatinoso, ou massas esbranquiçadas, sólidas e firmes de aspecto lobulado.

Ao exame microscópico caracterizaram-se por proliferação de ácinos e/ou ductos ectasiados (fig. 61), constituídos por epitélio luminal e mioepitélio sem atipia citológica. As células acinares apresentavam vacúolos citoplasmáticos, um aspecto idêntico ao observado na mama em lactação; era ainda comum a presença de secreção láctea nos ácinos e túbulos.

As Alterações fibroquísticas foram observadas frequentemente na periferia das neoplasias, em particular dos carcinomas.

Alteração fibroadenomatosa total (AFT)

Estas alterações (n=17) corresponderam a 13% da totalidade das massas mamárias analisadas e caracterizaram-se pelo seu desenvolvimento rápido, em uma semana a um mês, e por afectarem uma ou várias mamas em simultâneo, atingindo grandes dimensões. O tamanho médio foi de 5 cm (variando de 1,5 cm a 18 cm). A idade de aparecimento variou entre os 10 meses e os 10 anos mas, 53% das gatas (n=9), tinham idade igual ou inferior a 3 anos (fig. 62). Em 9 gatas obtivemos informação acerca da realização de tratamentos contraceptivos: a maioria destas gatas (n=6) tinha sido tratada e, uma das alterações surgiu numa gata de 10 meses, dois meses após a primeira administração de progestagénios.

À observação macroscópica eram lesões circunscritas mas não capsuladas, sólidas, de consistência branda, por vezes gelatinosa (fig. 63). Na superfície de corte apresentavam pequenas áreas esbranquiçadas rodeadas por tecidos gelatinosos. Por vezes observaram-se fendas similares às dos fibroadenomas. À observação microscópica eram proliferações fibroepiteliais similares aos fibroadenomas. Consistiam na proliferação de ductos, estruturas pseudo-acinosas ou quísticas, rodeadas por abundante estroma laxo, mixóide, e envolvidas

por tecido conjuntivo interlobular mais fibroso (fig. 64). O componente luminal, constituído por 2 ou 3 assentadas de células colunares com relação núcleo-citoplasma aumentado e mitoses frequentes, apresentava frequentemente diferenciação apócrina (n=6) e era envolvido por células mioepiteliais, fusiformes ou cúbicas. O estroma intralobular era rico em mucinas ácidas e apresentava fibroblastos fusiformes, piramidais ou estrelados com mitoses frequentes. O tecido conjuntivo interlobular era denso, com fibroblastos em repouso.

A ulceração e a necrose foram raras. O infiltrado inflamatório era escasso e de tipo linfoplasmocitário. A mama adjacente, sempre que representada (n=15; 88%) apresentava alteração fibroquística.

2.2. NEOPLASIAS BENIGNAS

Constituíram 10% (n=13) da totalidade da série em estudo e afectaram principalmente gatas de raça Europeu Comum de meia-idade (média 7,6 anos, variando entre os 3 e os 14 anos). O tamanho variou entre 0,4 e 11 cm mas, 54% das lesões (n=7) apresentaram dimensão inferior a 1 cm. Nove lesões (75%) eram múltiplas e surgiram preferencialmente nas mamas abdominais da cadeia esquerda. Doze lesões (92%) apresentaram na mama adjacente alteração fibroquística, frequentemente com vacuolização das células acinares.

Adenoma tubular

Surgiram em gatas de raça Europeu Comum (n=1) e Siamesa (n=2), duas jovens (4 e 5 anos) e sem história de tratamentos contraceptivos, e numa gata de 14 anos submetida a tratamentos contraceptivos regulares. Duas encontravam-se na periferia de carcinomas.

À observação macroscópica eram nódulos firmes, circunscritos, de pequenas dimensões (mínimo 0,55 cm; máximo 2,1 cm). Ao exame microscópico caracterizaram-se por proliferação de túbulos uniformes (fig. 66) revestidos por células epiteliais monomórficas e rodeados por mioepitélio. O padrão de crescimento era expansivo e as mitoses raras. O estroma, escasso, apresentava infiltrado inflamatório escasso, de tipo linfoplasmocitário.

Adenoma epitelial-mioepitelial (adenoma complexo)

Estas 2 lesões surgiram em gatas de raça Europeu Comum, idosas (9 e 10 anos); eram nódulos pequenos (0,4 cm e 0,85 cm), firmes, bem delimitados, de cor esbranquiçada. Um adenoma surgiu na periferia de um carcinoma.

O epitélio luminal era constituído por células basófilas, cúbicas, que adoptavam disposição tubular (fig. 67). A envolver as células luminais observavam-se múltiplas camadas de mioepitélio (fig. 68) que, ocasionalmente, apresentavam mitoses. Um adenoma apresentou esclerose central, necrose e focos de calcificação.

Papiloma

Surgiu numa gata Europeu Comum na periferia de um carcinoma e caracterizou-se por proliferação intraductal de papiloma invertido (fig. 69). Era constituído por células luminais monomórficas, cubóides ou redondas, de citoplasma clarificado e núcleo eucromático, que formavam ninhos sólidos, e por células mioepiteliais. As mitoses eram raras; o estroma escasso evidenciava raras células gigantes multinucleadas de tipo osteoclasto. As células de revestimento ductal também apresentavam citoplasma clarificado.

Fibroadenoma

Os fibroadenomas foram o tipo de neoplasia benigna mais frequente, correspondendo a 5% (n=7) da totalidade da série analisada e a 53,8% das neoplasias benignas. Surgiram em gatas de raça Europeu Comum, de meia-idade: 71% (n=5) apresentavam idade igual ou superior a 6 anos (mínimo 3 e máximo 8 anos). Quatro gatas tinham efectuado tratamentos contraceptivos e nas restantes não foi possível obter esta informação. Afectavam uma ou duas mamas de uma cadeia mamária (principalmente nas inguinais). Só uma lesão surgiu numa gata com carcinoma de mama.

À observação macroscópica eram massas sólidas, circunscritas, móveis, com dimensões entre 0,8 e 11 cm (média 4,4 cm). Ao corte eram constituídos por tecidos esbranquiçados e firmes, com espaços em forma de fenda. A ulceração foi rara, apenas observada numa lesão de grandes dimensões. Ao exame microscópico caracterizaram-se por proliferação bifásica, constituída por uma ou duas camadas de células epiteliais rodeadas por mioepitélio. O componente conjuntivo, abundante, apresentava 2 tipos de estroma, um laxo intralobular, envolvido por estroma fibroso interlobular, como foi previamente referido na AFT. Observaram-se variações no grau de colagenização e/ou da alteração mixóide do estroma (fig. 70). As mitoses eram raras quer no componente epitelial, quer no estroma. Apenas um caso apresentou metaplasia escamosa. O infiltrado inflamatório era escasso na maioria das lesões e de tipo linfoplasmocitário. Ocasionalmente observaram-se células gigantes multinucleadas de tipo osteoclasto no lúmen das estruturas epiteliais.

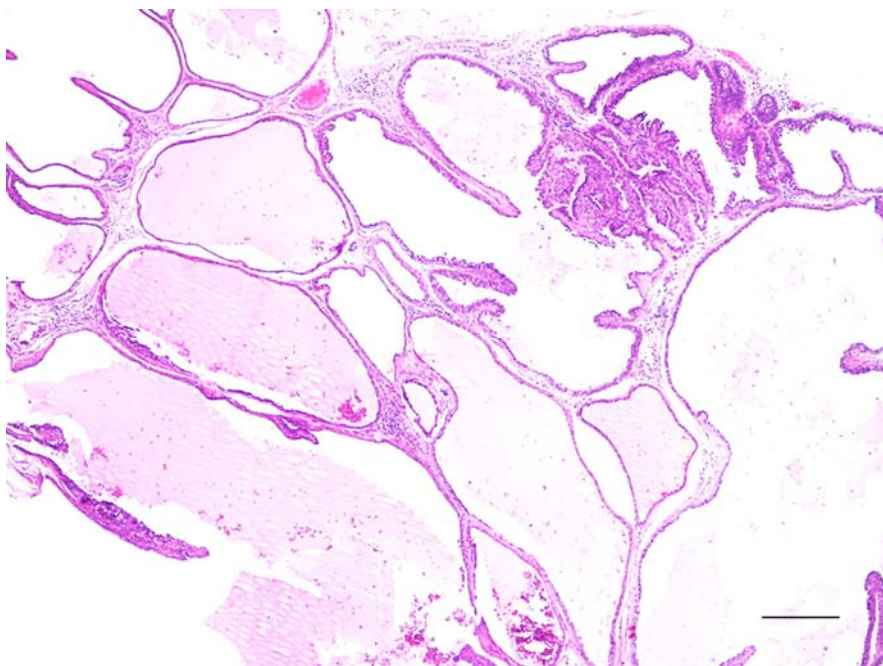


Fig. 61. Alteração fibroquística. Estalão = 300 μ m.



Fig. 62. Gata jovem evidenciando alteração fibroadenomatosa total com envolvimento de várias glândulas mamárias.

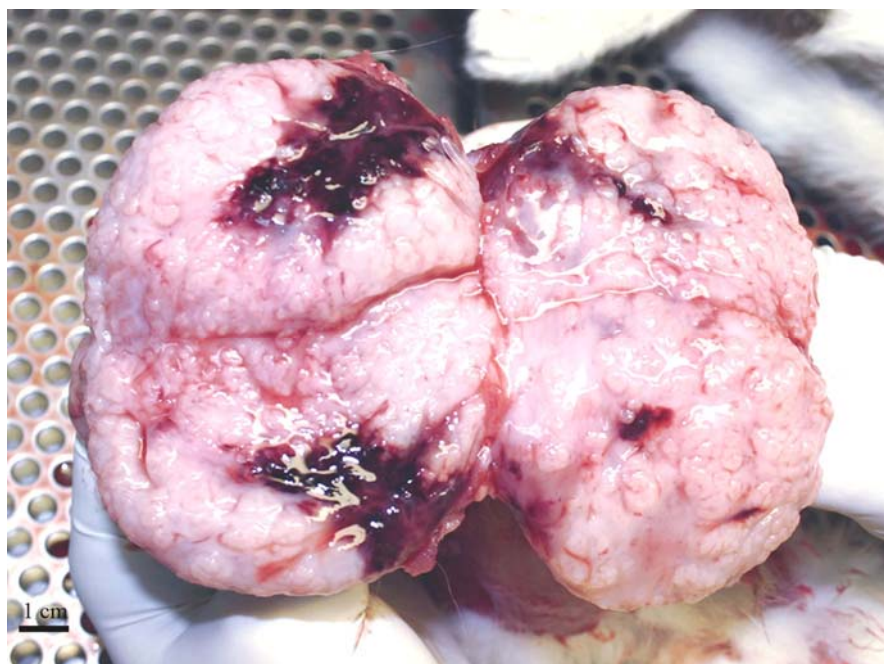


Fig. 63. Secção transversal de uma glândula mamária com alteração fibroadenomatosa total evidenciando áreas de hemorragia e necrose.

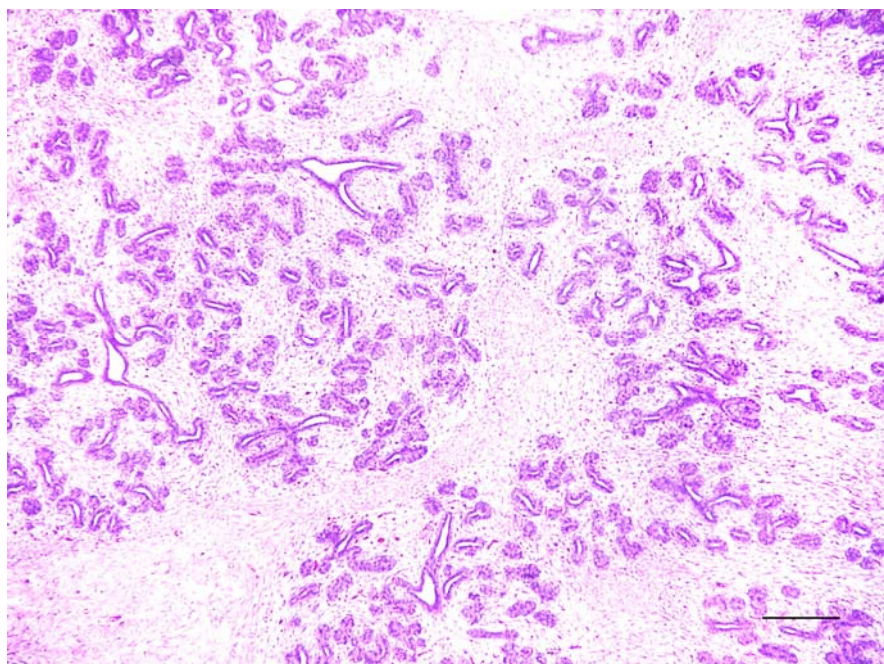


Fig. 64. Alteração fibroadenomatosa total evidenciando extensa ramificação ductal. Estalão = 300 µm.

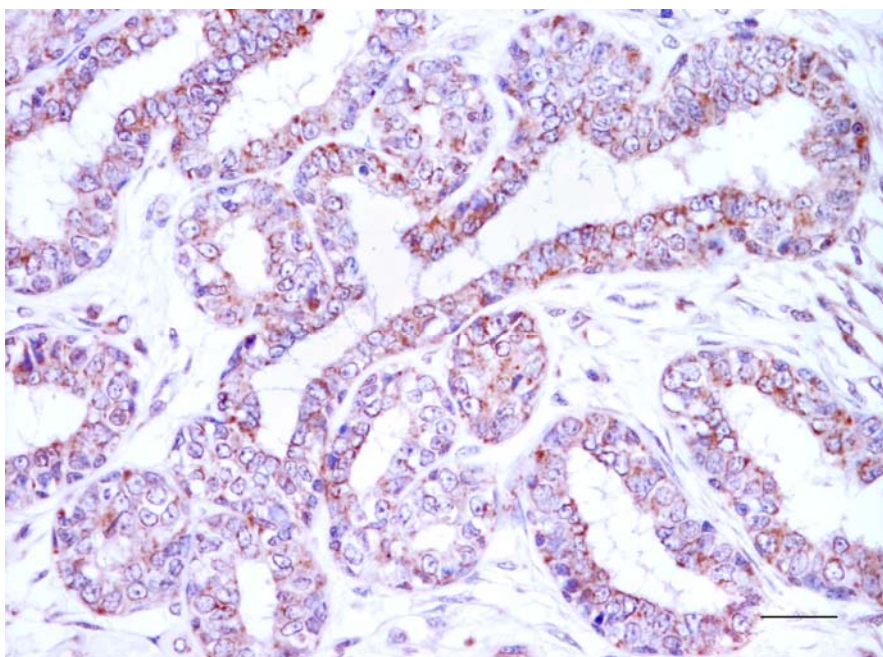


Fig. 65. Alteração fibroadenomatosa total evidenciando imuno-expressão de MMP2. Estalão = 60 μ m.

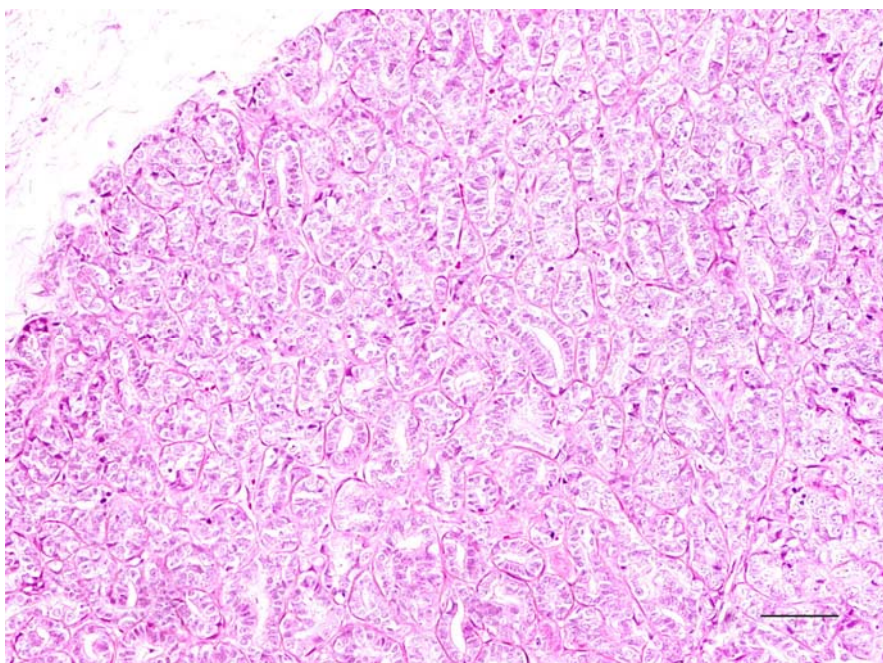


Fig. 66. Adenoma tubular. Estalão = 60 μ m.

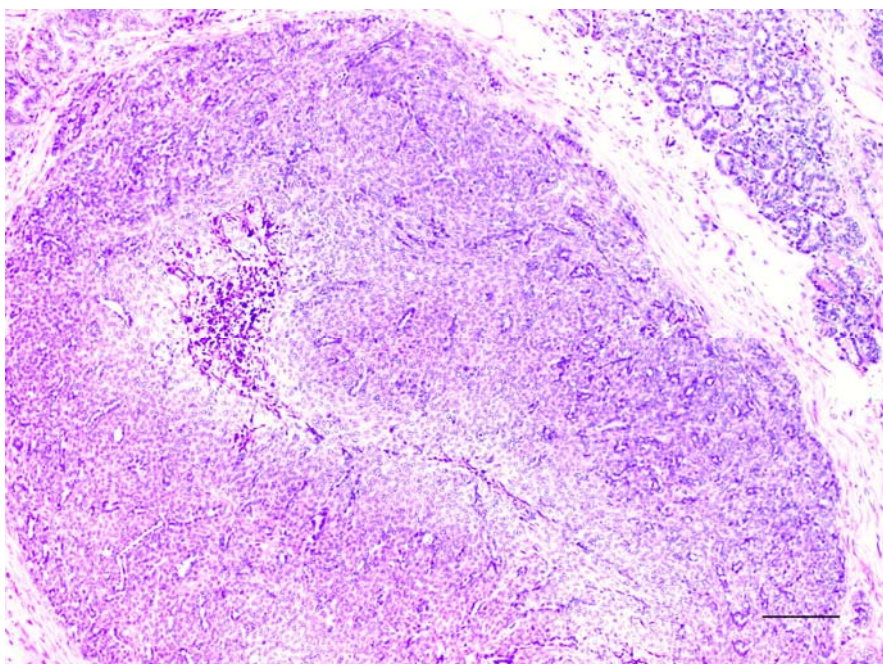


Fig.67. Adenoma complexo. Estalão = 120 µm.

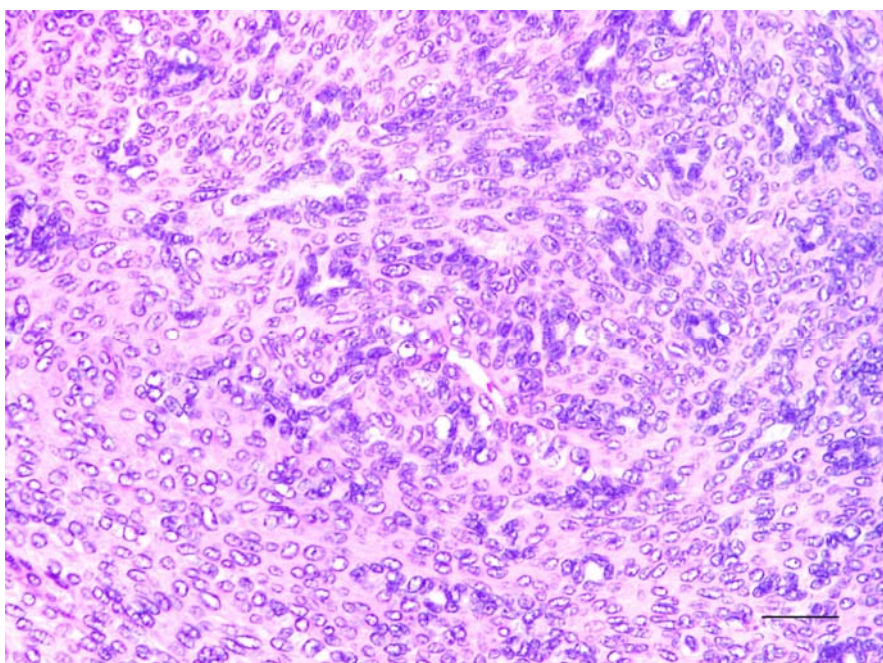


Fig. 68. Ampliação da lesão anterior evidenciando população mioepitelial abundante. Estalão = 30 µm.

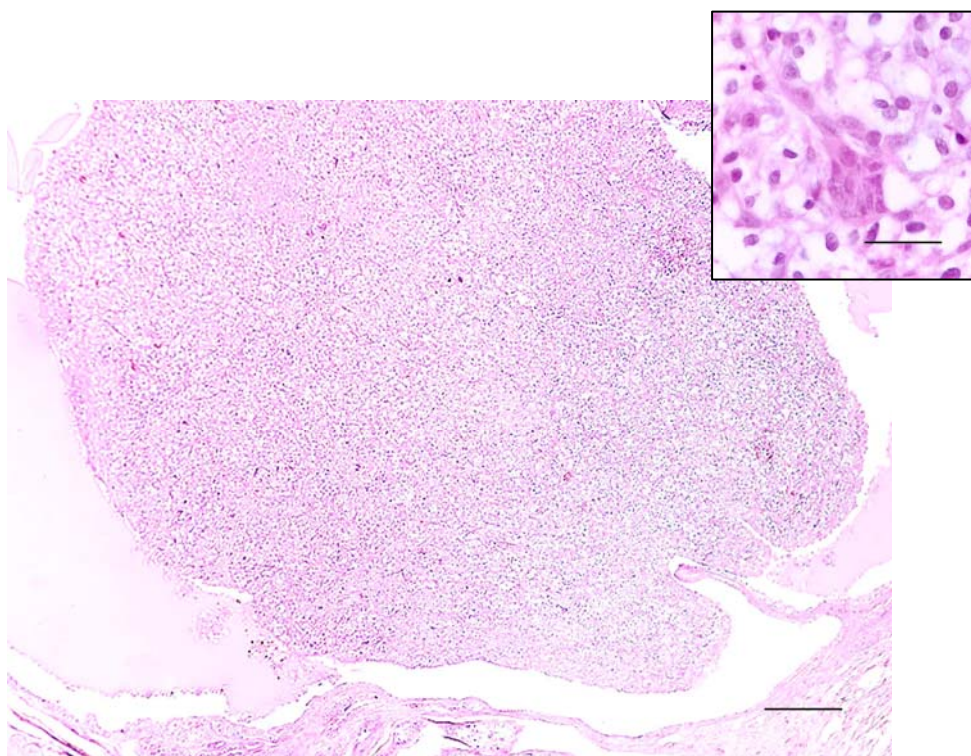


Fig. 69. Papiloma de padrão invertido com células de citoplasma clarificado e células gigantes multinucleadas. Estalão = 300 μ m. Estalão insert = 30 μ m.

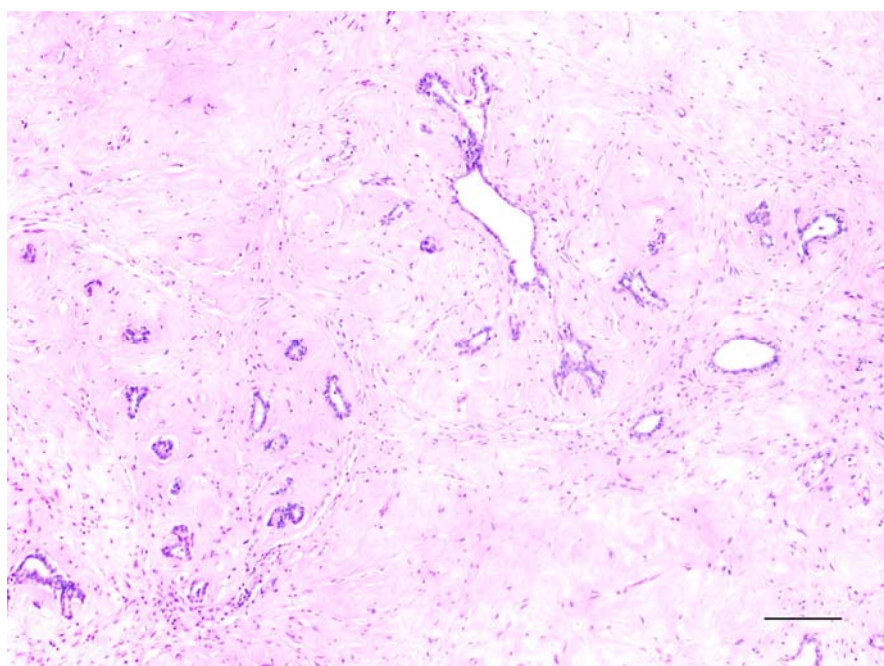


Fig. 70. Fibroadenoma com esclerose do estroma. Estalão = 300 μ m.

3. ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS CARCINOMAS E OS OUTROS TIPOS HISTOLÓGICOS

VARIÁVEIS CLÍNICO-PATOLÓGICAS E COMPORTAMENTO BIOLÓGICO

No quadro 19 estão expressas as associações entre as variáveis clínico-patológicas e o tipo histológico. Da sua análise verificámos que a raça Europeu Comum foi a apresentou maior frequência de alterações/lesões mamárias. Observaram-se diferenças significativas nos escalões etários dos 3 tipos histológicos em estudo, quer analisando o valor médio ($p<0,0001$) (quadro 20) quer avaliando a variável categorizada em 3 classes ($p<0,0001$). A maioria das alterações não malignas ocorreu a idades inferiores a 8 anos, enquanto a maioria dos carcinomas surgiu em gatas com idade superior a 11 anos.

Também no tamanho se observaram diferenças significativas ($p=0,012$): a maioria das alterações não neoplásicas apresentava dimensão superior a 3 cm mas, apenas 15% das neoplasia benignas e 29% das malignas apresentavam essa dimensão.

Quadro 20. Idade das gatas e tamanho dos nódulos mamários.

	Alterações não neoplásicas n=23	Neoplasias benignas n=13	Neoplasias malignas n=88	p
Idade (anos)				
Média±SD	4,75±3,29	7,61±3,28	11,23±3,13	<0,0001
Mínimo-Máximo	1,00-10,00	3,00-14,00	4,00-19,00	
Tamanho (cm)				
Mediana	3,50	2,72	2,55	0,008
Mínimo-Máximo	0,40-18,00	0,40-11,00	0,30-7,00	

(SD: Desvio padrão)

A multifocalidade ocorreu maioritariamente em carcinomas ($p<0,0001$) e associou-se de forma significativa com critérios clássicos de malignidade como a invasão (0,002), a necrose (0,013), a metastização (0,012) (quadro 1 do anexo VI). A ulceração, a necrose e a diferenciação epidermóide associaram-se quase exclusivamente aos carcinomas ($p=0,016$; $p<0,0001$, $p<0,0001$, respectivamente). O infiltrado inflamatório, de tipo linfoplasmocitário era escasso na maioria das alterações/lesões não malignas, mas era moderado ou abundante na maioria dos carcinomas. Esta diferença não foi porém estatisticamente significativa.

Quadro 19. Associação das características clínico-patológicas com o tipo histológico.

Parâmetro	Alterações não neoplásicas n (%)	Neoplasias benignas n (%)	Neoplasias malignas n (%)	p
Raça				
Europeu	19 (82,6)	11 (84,6)	53 (56,4)	0,12
Siamês	2 (8,7)	2 (15,4)	34 (36,2)	
Persa	1 (4,3)	0 (0,0)	2 (2,1)	
Cruzado	1 (4,3)	0 (0,0)	5 (5,3)	
Idade (anos) n=121				
<8	15 (75,0)	7 (53,8)	10 (11,4)	<0,0001
8-11	5 (25,0)	4 (30,8)	34 (38,6)	
>11	0 (0,0)	2 (15,4)	44 (50,0)	
Multifocalidade (n=119)				
Solitário	16 (80,0)	3 (25,0)	18 (20,7)	<0,0001
Múltiplo	4 (20,0)	9 (75,0)	69 (79,3)	
Cadeia mamária (n=77)				
Direita	5 (33,3)	2 (28,6)	15 (27,3)	0,5
Esquerda	9 (60,0)	5 (71,4)	28 (50,9)	
Ambas	1 (6,7)	0 (0,0)	12 (21,8)	
Localização (n=87)				
Craneal (par 1/2)	6 (33,3)	1 (16,7)	20 (31,7)	0,7
Caudal (par 3/4)	10 (55,6)	4 (66,7)	28 (44,4)	
Ambos os pares	2 (11,1)	1 (16,7)	15 (23,8)	
Contracepção (n=77)				
Não	3 (27,3)	3 (37,5)	16 (27,6)	0,9
Sim	8 (72,7)	5 (62,5)	42 (72,4)	
Tamanho (cm)				
<2	7 (30,4)	8 (61,5)	31 (33,0)	0,012
2-3	3 (13,0)	3 (23,1)	36 (38,3)	
>3	13 (56,5)	2 (15,4)	27 (28,7)	
Ulceração				
Ausente	22 (95,7)	12 (92,3)	65 (69,1)	0,009
Presente	1 (4,3)	1 (7,7)	29 (30,9)	
Necrose				
Ausente	22 (95,7)	12 (92,3)	5 (5,3)	<0,0001
Presente	1 (4,3)	1 (7,7)	89 (94,7)	
Tipo de crescimento				
Expansivo	23 (100,0)	13 (100,0)	34 (36,2)	<0,0001
Infiltrativo	0 (0,0)	0 (0,0)	60 (63,8)	
Diferenciação epidermóide				
Ausente	23 (100,0)	12 (92,3)	28 (29,8)	<0,0001
Presente	0 (0,0)	1 (7,7)	66 (70,2)	
Diferenciação apócrina				
Ausente	16 (69,6)	12 (92,3)	56 (59,6)	0,06
Presente	7 (35,0)	1 (7,7)	38 (40,4)	
Estroma				
Escasso	6 (33,3)	3 (25,0)	49 (52,7)	<0,0001
Moderado	0 (0,0)	2 (16,7)	37 (39,8)	
Abundante	17 (73,9)	7 (58,3)	7 (7,5)	
Infiltrado inflamatório				
Escasso	22 (95,7)	8 (61,5)	43 (45,7)	0,001
Moderado	1 (4,3)	3 (23,1)	25 (26,6)	
Abundante	0 (0,0)	2 (15,4)	26 (27,7)	

PROLIFERAÇÃO CELULAR E COMPORTAMENTO BIOLÓGICO

As mitoses eram raras nas lesões benignas e nas alterações não neoplásicas variaram de pouco a muito frequentes; não se observaram atipias mitóticas. A proliferação nos carcinomas era elevada, com mitoses em posição suprabasal e atípicas, e índices de Ki-67 particularmente altos. As diferenças entre os 3 tipos histológicos foram muito significativas, como se verifica nas figuras 71 e 72 e no quadro 1 do anexo VII. Observaram-se também diferenças significativas entre os dois índices proliferativos ($p < 0,0001$).

Algumas alterações hiperplásicas, principalmente as alterações fibroadenomas, apresentaram índices de proliferação celular próximos dos observados nos carcinomas. Nas alterações fibroadenomas e nos fibroadenomas, as mitoses não se restringiam ao componente epitelial, sendo observadas no estroma intralobular. Quando comparámos os índices mitótico e de Ki-67 destas 2 alterações fibroepiteliais observam-se diferenças significativas ($p = 0,003$ e $p < 0,0001$, respectivamente; fig. 73; quadros 2 e fig. 1 do anexo VII). As alterações fibroadenomas apresentam valores dos índices de proliferação celular muito elevados, o que se reflecte nas informações clínicas de lesões de grandes dimensões, de crescimento rápido.

Quando analisámos separadamente os índices de proliferação do componente epitelial e do estroma destas alterações fibroepiteliais, observaram-se também diferenças acentuadas, apresentando as alterações fibroadenomas sempre valores muito superiores (quadro 21).

Observaram-se também diferenças muito significativas entre os índices mitótico e de Ki-67 das alterações fibroadenomas (AFTs) e fibroquísticas ($p = 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente; fig. 74; quadro 3 e fig. 2 do anexo VII).

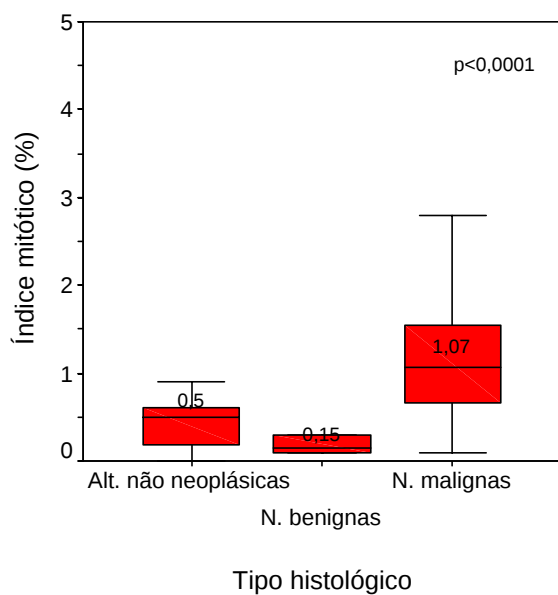


Fig. 71. Comparação do índice mitótico nos 3 tipos de alteração da glândula mamária.

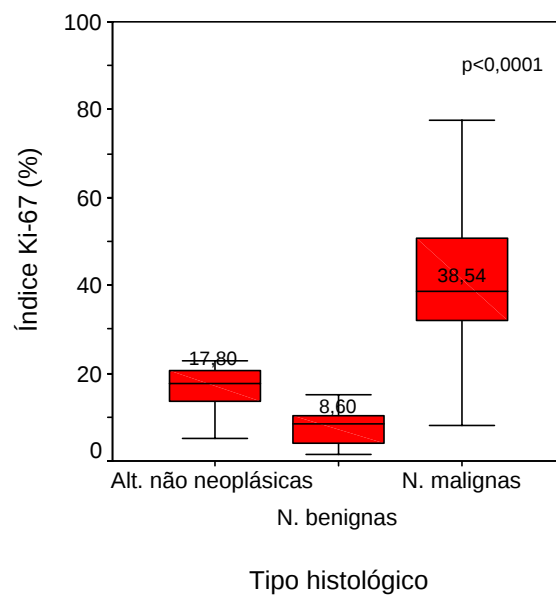


Fig. 72. Comparação do índice de Ki-67 nos 3 tipos de alteração da glândula mamária.

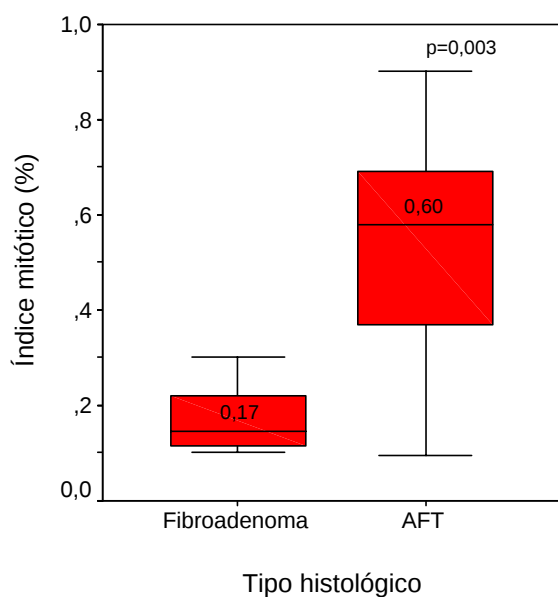


Fig. 73. Comparação do índice mitótico entre alterações fibroadenomatosas (AFT) e fibroadenomas.

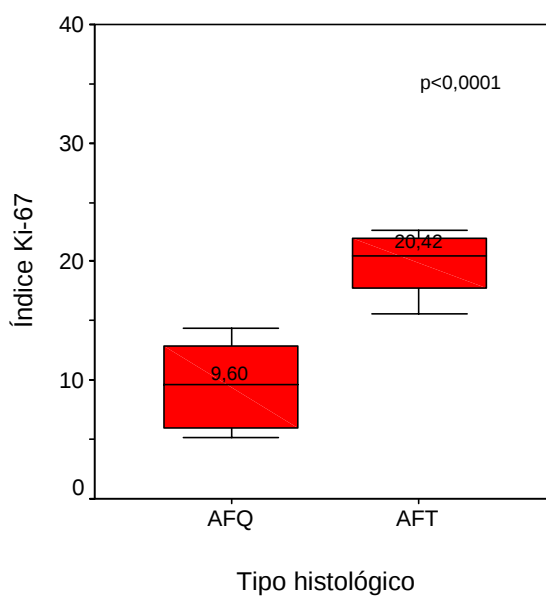


Fig. 74. Comparação do índice de Ki-67 entre as alterações fibroadenomatosas (AFT) e as alterações fibroquísticas (AFQ).

Quadro 21. Análise comparativa dos índices de proliferação celular das alterações fibroadenomatosas (AFTs) e dos fibroadenomas nos componentes epitelial e estromal.

	AFT	Fibroadenoma	p
Índice mitótico - epitélio			
Mediana	0,77	0,26	0,004
Mínimo-Máximo	0,10-1,10	0,10-0,60	
Índice mitótico - estroma			
Mediana	0,39	0,10	0,002
Mínimo-Máximo	0,09-0,96	0,0-0,19	
Índice ki-67 - epitélio			
Mediana	24,80	13,40	<0,0001
Mínimo-Máximo	19,20-48,52	2,20-17,60	
Índice ki-67 - estroma			
Mediana	15,10	4,70	<0,0001
Mínimo-Máximo	7,70-25,98	0,80-10,40	

COMPARAÇÃO DO TIPO HISTOLÓGICO COM AS VARIÁVEIS IMUNO-HISTOQUÍMICAS

No quadro 22 estão expressas as associações entre as variáveis imuno-histoquímicas e os 3 tipos histológicos avaliados.

Quadro 22. Associação das variáveis imuno-histoquímicas e o tipo histológico.

Parâmetro	Alterações não neoplásicas n(%)	Neoplasias benignas n(%)	Neoplasias malignas n(%)	p
Caderina E				
Preservada	20 (87,0)	11 (84,6)	27 (28,7)	<0,0001
Diminuída	3 (13,0)	2 (15,4)	67 (71,3)	
Caderina E				
Membranar	20 (87,0)	10 (76,9)	18 (19,1)	<0,0001
Aberrante	3 (13,0)	3 (23,1)	76 (80,9)	
β-Catenina				
Preservada	20 (87,0)	12 (92,3)	30 (31,9)	<0,001
Diminuída	3 (13,0)	1 (7,7)	64 (68,1)	
β-Catenina				
Membranar	22 (19,6)	10 (76,9)	42 (44,7)	<0,0001
Aberrante	1 (4,3)	3 (23,1)	52 (55,3)	
MMP1				
Baixo	8 (34,8)	8 (61,5)	27 (28,7)	0,06
Alto	15 (65,2)	5 (38,5)	67 (71,3)	
MMP2				
Baixo	10 (43,5)	4 (30,8)	13 (14,1)	0,006
Alto	13 (56,5)	9 (69,2)	79 (85,9)	
TIMP1				
Baixo	12 (52,2)	11 (84,6)	50 (53,2)	0,09
Alto	11 (47,8)	2 (15,4)	44 (46,8)	
VEGF				
Baixo	8 (34,8)	7 (53,8)	20 (21,3)	0,03
Alto	15 (65,2)	6 (46,2)	74 (78,7)	

Vimentina e marcadores de diferenciação mioepitelial (CK14, p63 e calponina)

A expressão de vimentina e CK14 foi usualmente negativa nas células luminais das alterações mamárias de carácter benigno mas foi bem evidente, e com extensão variável, nos carcinomas. A expressão de vimentina e dos marcadores de diferenciação mioepitelial foi bem patente no mioepitélio das alterações mamárias não neoplásicas e neoplasias benignas, tendo sido menos frequente nos carcinomas.

Caderina E e β -Catenina

As alterações proliferativas não neoplásicas e benignas exibiram o padrão de imunoreactividade membranar característico destas moléculas de adesão. As células mioepiteliais apresentaram frequentemente positividade membranar e/ou citoplasmática.

A marcação foi observada na totalidade da série em estudo e, na maioria dos casos, era difusa (preservada), de intensidade forte (+++) e homogénea. Ocasionalmente observou-se positividade citoplasmática aberrante. O item expressão aberrante refere-se à ocorrência de expressão anómala, independentemente da sua extensão; o item expressão membranar refere-se às alterações/lesões exclusivamente com marcação membranar.

No que diz respeito aos carcinomas, a maioria das lesões apresentaram expressão diminuída, heterogénea, com aumento de expressão aberrante (citoplasmática e/ou nuclear). Estas diferenças da expressão de Caderina E e β -Catenina nos 3 tipos de proliferação mamária atingiram elevado significado estatístico.

MMP1, MMP2; TIMP1 e VEGF

Observaram-se diferenças significativas na expressão de MMP2 e VEGF nos 3 tipos de alterações mamárias analisadas, que foi nitidamente superior nos carcinomas (fig. 75). As diferenças na expressão de MMP1 e TIMP não foram significativas devido, em grande parte, às alterações fibroadenomatosas que evidenciaram expressão alta dos vários marcadores (fig. 65).

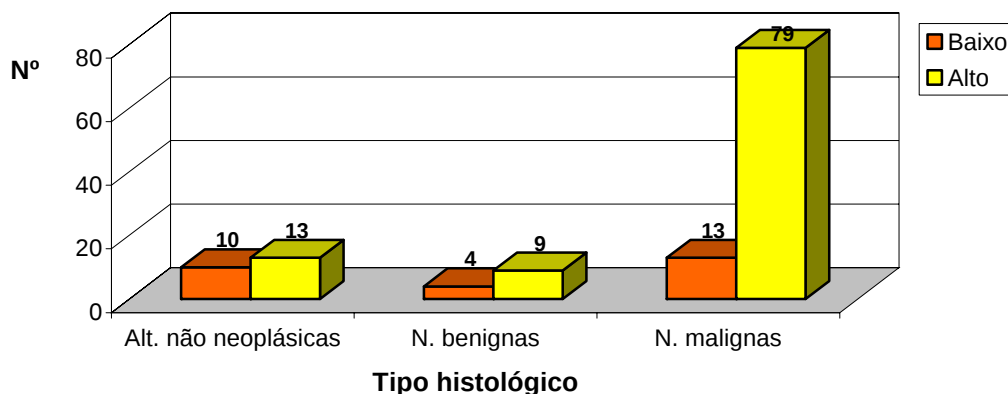


Fig. 75. Expressão de MM2 nos vários tipos histológicos ($p=0.006$).

4. ESTUDO DA MAMA ADJACENTE AOS CARCINOMAS

Foram analisadas 25 lesões de CDIS e 39 alterações fibroquísticas presentes na periferia dos carcinomas. A maioria das lesões de CDIS era de padrão sólido ou relacionado, como o micropapilar e cribriforme (15/25), ou de padrão morfológico misto (7/25). As formas puras foram raras (4/25). A maioria encontrava-se na periferia de CDI-STE ($n=20$), quatro adjacentes a carcinomas metaplásicos e um a CEM.

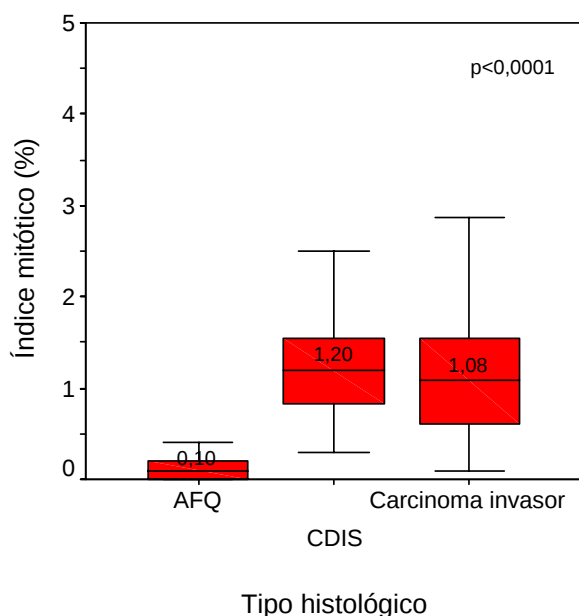


Fig. 76. Comparação do índice mitótico entre os carcinomas e as alterações mamárias presentes na sua periferia.

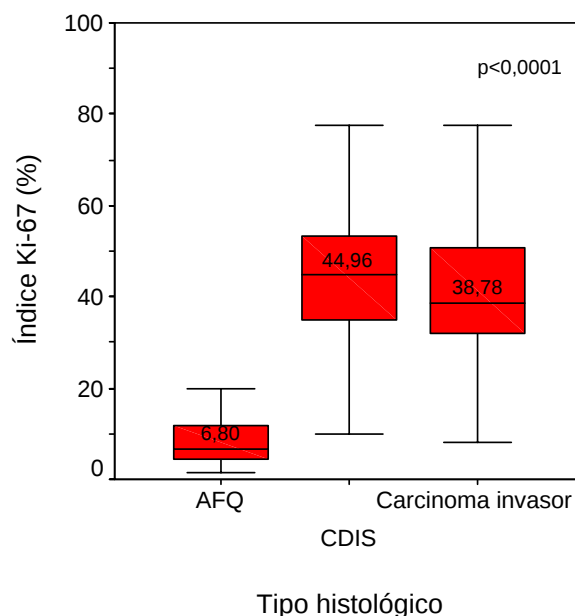


Fig. 77. Comparação do índice de Ki-67 entre os carcinomas e as alterações mamárias presentes na sua periferia.

As alterações fibroquísticas e CDIS evidenciaram a normal positividade das células mioepiteliais à vimentina, p63, CK14 e calponina. As células luminais evidenciaram positividade ocasional à vimentina e CK14, em particular nas lesões de CDIS. Relativamente aos outros marcadores estudados observou-se um aumento quer da actividade proliferativa (fig. 76 e 77 e quadro 4 do anexo VII) quer da expressão de metaloproteinases da matriz, de TIMP1 e VEGF (quadro 23), das alterações fibroquísticas para o carcinoma *in situ* e deste para o invasor. Observou-se ainda perda progressiva da expressão de Caderina E e β -Catenina com a cancerização e com a aquisição do potencial invasor.

Quadro 23. Comparação das variáveis imuno-histoquímicas entre os carcinomas e as alterações mamárias presentes na sua periferia.

Parâmetro	AFQ	CDIS	Carcinoma	p
Caderina E				
Preservada	39 (100,0)	13 (52,0)	26 (28,0)	<0,0001
Diminuída	0 (0,0)	12 (48,0)	67 (72,0)	
β-Catenina				
Preservada	39 (100,0)	21 (84,0)	29 (31,2)	<0,0001
Diminuída	0 (0,0)	4 (16,0)	64 (68,8)	
MMP1				
Baixo	25 (64,1)	16 (64,0)	17 (29,0)	<0,0001
Alto	14 (35,9)	9 (36,0)	66 (71,0)	
MMP2				
Baixo	31 (79,5)	15 (60,0)	12 (12,9)	<0,0001
Alto	8 (20,5)	10 (40,0)	81 (87,1)	
TIMP1				
Baixo	32 (82,1)	17 (68,0)	49 (12,9)	0,005
Alto	7 (17,9)	8 (32,0)	44 (47,3)	
VEGF				
<3	24 (63,2)	12 (48,0)	25 (26,9)	<0,0001
≥ 3	14 (36,8)	13 (52,0)	68 (73,1)	

5. COMPARAÇÃO DA MAMA ADJACENTE A CARCINOMAS COM A MAMA NÃO ASSOCIADA A NEOPLASIAS.

Alteração fibroquística (AFQ)

Analísámos 6 alterações fibroquísticas solitárias (ou seja, não associadas a lesão mamária), que foram comparadas com as alterações fibroquísticas presentes na periferia dos carcinomas. Não se observaram diferenças significativas entre estas (quadros e 24 e 25), contudo, as alterações não associadas a carcinoma evidenciaram um aumento da expressão de metaloproteinases de matriz, TIMP e VEGF, sugestivas de alguma instabilidade celular.

Quadro 24. Comparação das variáveis imuno-histoquímicas entre as alterações fibroquísticas solitárias e as presentes na periferia dos carcinomas.

	AFQ		p
	Não adjacente a neoplasia (n=6)	Adjacente a carcinoma (n=39)	
Caderina E			
Preservada	5 (83,3)	39 (100,0)	0,13
Diminuída	1 (16,7)	0 (0,0)	
β-Catenina			1,00
Preservada	6 (100,0)	39 (100,0)	
Diminuída	0 (0,0)	0 (0,0)	
MMP1			0,07
Baixo	1 (16,7)	25 (64,1)	
Alto	5 (83,3)	14 (35,9)	
MMP2			0,60
Baixo	4 (66,7)	31 (79,5)	
Alto	2 (33,3)	8 (20,5)	
TIMP1			0,11
Baixo	3 (50,0)	32 (82,1)	
Alto	3 (50,0)	7 (17,9)	
VEGF			0,21
<3	2 (33,3)	24 (63,2)	
≥ 3	4 (66,7)	14 (36,8)	

Quadro 25. Comparação dos índices proliferativos entre as alterações fibroquísticas solitárias e as presentes na periferia dos carcinomas.

	AFQ		p
	Solitária (n=6)	Adjacente a carcinoma (n=39)	
Índice mitótico			0,15
Mediana	0,00	0,10	
Mínimo-Máximo	0,00-0,30	0,00-0,500	
Índice Ki-67			0,30
Mediana	9,60	6,80	
Mínimo-Máximo	5,20-14,45	1,30-28,90	

CDIS

O carcinoma papilar *in situ* apresentou índices de proliferação celular altos (índice mitótico 0,97; índice Ki-67 31,9%), expressão focal de vimentina e CK14 nas células luminiais, fenótipo preservado de caderina E e β -catenina e expressão alta de MMP1 e VEGF. Como referido anteriormente (quadro 24), os CDIS adjacentes aos carcinomas evidenciaram características similares mas apresentaram diminuição da expressão de Caderina E e β -catenina.

6. ESTUDO DE SOBREVIVÊNCIA

O estudo da sobrevivência só foi efectuado nas neoplasias malignas, em virtude de todas as gatas, com alterações de carácter benigno se encontrarem vivas e sem doença oncológica no final do período de seguimento. Apenas uma gata com um fibroadenoma morreu durante o estudo, mas por causas não oncológicas. Os animais foram seguidos desde a data da cirurgia, de Janeiro de 2001, até ao dia 31 de Dezembro de 2004. O tempo máximo de seguimento foi de 44 meses. Uma gata com CEM foi perdida para o estudo de seguimento 5 meses após a cirurgia, não tendo sido incluída na amostra analisada; no final desse período estava livre de doença oncológica.

I. SOBREVIVÊNCIA TOTAL (ST)

Obtivemos informação sobre a sobrevivência total em 65 casos. No fim do estudo, 54 gatas (83%) tinham morrido ou tinham sido eutanasiadas por doença oncológica (recidiva local, novos tumores ou doença metastásica). O tempo mediano de sobrevivência total foi de 8 meses.

ASSOCIAÇÃO ENTRE A SOBREVIVÊNCIA TOTAL E OS PARÂMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS E IMUNO-HISTOQUÍMICOS

No quadro 26 apresentamos as associações entre as características clínico-patológicas e a sobrevivência. Da sua análise verificámos que os melhores indicadores de prognóstico foram a idade ($p=0,012$), as dimensões da massa neoplásica ($p=0,0006$), o tipo histológico ($p=0,001$), o grau histológico ($p=0,0001$), o grau nuclear ($p=0,009$), a permeação vascular ($p=0,0001$), a metastização dos gânglios linfáticos regionais ($p<0,0001$) e os índices mitótico e de Ki-67 ($p=0,0018$ e $p=0,004$, respectivamente). De seguida vamos referir-nos a estes parâmetros e a outros que não tendo atingido significado estatístico, também nos forneceram informação importante relativa à sobrevivência.

Idade

A idade associou-se de forma significativa à sobrevivência total, que diminuiu de forma acentuada nas gatas de idade superior a 11 anos ($p=0,012$; fig.1 do anexo VIII). Neste grupo a sobrevivência cumulativa aos 12 meses foi de cerca de 20% enquanto nos outros grupos etários foi de 50%.

Quadro 26. Análise univariada da sobrevivência total e associação com as variáveis clínico-patológicas e imuno-histoquímicas.

Variáveis	n	Sobrevivência cumulativa		Tempo mediano de ST (meses)	p
		Aos 12 meses	No fim do período de seguimento		
		n (%)	n (%)		
Idade (anos)					
<8	6	3 (50,0)	3 (33,3)	8	0,012
8-11	29	17 (58,6)	8 (27,6)	19	
>11	26	5 (19,2)	0 (0,0)	6	
Tamanho (cm)					
<2	21	15 (71,4)	7 (33,3)	18	0,0006
2-3	25	9 (36,0)	4 (16,0)	8	
>3	19	3 (15,8)	0 (0,0)	5	
Ulceração					
Ausente	45	21 (46,7)	10 (22,2)	9	0,099
Presente	20	6 (30,0)	1 (5,0)	6	
Tipo histológico					
CDIS	1	1 (100,0)	1 (100,0)	--	0,001
CEM	6	4 (66,7)	4 (66,7)	-- (média 27,3)	
CDI-STE	45	22 (48,9)	6 (13,3)	10	
C. metaplásico	7	0 (0,0)	0 (0,0)	3	
C micropapilar	6	0 (0,0)	0 (0,0)	4	
Grau histológico (n=64)					
Grau I	4	4 (100,0)	2 (50,0)	36	<0,0001
Grau II	28	19 (67,9)	8 (28,6)	18	
Grau III	32	3 (9,0)	0 (0,0)	6	
Grau nuclear					
Grau 2	24	16 (66,7)	7 (29,7)	19	0,009
Grau 3	41	11 (26,8)	4 (9,8)	7	
Estadio					
I	21	16 (76,2)	9 (42,9)	24	<0,0001
II	13	7 (53,9)	2 (15,4)	13	
III/IV	31	4 (12,9)	1 (0,0)	6	
Necrose					
Ausente	2	2 (100,0)	0 (0,0)	--	0,19
Células isoladas	6	4 (66,7)	2 (33,3)	13	
Extensa	35	10 (28,6)	7 (12,3)	8	
Invasão					
Ausente	1	1 (100,0)	1 (100,0)	--	0,39
Estroma	40	18 (42,5)	8 (20,0)	8	
Muscular	24	9 (37,5)	2 (8,3)	7	
Diferenciação epidermóide					
Ausente	15	8 (53,3)	4 (26,7)	13	0,45
Presente	50	19 (38,0)	7 (14,0)	8	
Padrão de crescimento					
Expansivo	19	8 (42,1)	6 (31,6)	9	0,35
Infiltrativo	46	9 (34,6)	5 (10,9)	8	
Permeação vascular					
Ausente	20	15 (75,0)	10 (50,0)	36	0,0001
Presente	45	12 (26,7)	1 (2,2)	7	
Metástase ganglionar					
Ausente	48	27 (56,3)	11 (22,9)	12	<0,0001
Presente	17	0 (0,0)	0 (0,0)	2	
Índice mitótico					
Baixo (<1,1)	29	18 (62,1)	10 (34,5)	19	0,0018
Alto ($\geq 1,1$)	36	9 (25,0)	1 (2,8)	7	

Quadro 26 (continuação). Análise univariada da sobrevivência total e associação com as variáveis clínico-patológicas e imuno-histoquímicas.

Variáveis	n	Sobrevivência cumulativa		Tempo mediano de ST (meses)	p
		Aos 12 meses n (%)	No fim do período de seguimento n (%)		
Índice de Ki 67					
Baixo (<35,5)	35	20 (57,1)	9 (25,7)	13	0,004
Alto (≥35,5)	30	7 (23,3)	2 (6,7)	7	
Caderina E					
Preservada	19	10 (52,6)	5 (26,3)	13	0,50
Diminuída	46	17 (37,0)	6 (13,0)	8	
β-Catenina					
Preservada	21	8 (38,1)	3 (14,3)	9	0,96
Diminuída	44	19 (43,2)	8 (18,2)	8	
MMP 1					
Baixo	17	9 (52,9)	5 (29,4)	13	0,33
Alto	31	18 (37,5)	6 (12,5)	8	
MMP 2					
Baixo	8	5 (62,5)	3 (37,5)	18	0,15
Alto	57	22 (38,6)	8 (14,0)	8	
TIMP 1					
Baixo	32	13 (40,6)	6 (18,8)	7	0,80
Alto	33	14 (42,4)	5 (15,2)	9	
VEGF					
<3	13	13 (40,6)	4 (30,8)	19	0,12
≥3	52	18 (34,6)	7 (13,5)	8	
HER-2/neu					
Negativo	57	25 (43,9)	10 (17,5)	9	0,68
Positivo	8	2 (25,0)	1 (12,5)	7	

Tamanho

A sobrevivência total diminuiu com o aumento das dimensões da massa neoplásica ($p=0,0006$), evidenciando as gatas com carcinomas de tamanho superior a 3 cm os piores tempos de sobrevivência (fig. 78).

Tipo histológico

Observaram-se diferenças significativas na sobrevivência total dos vários tipos histológicos avaliados ($p=0,001$; fig. 79). Salientaram-se os carcinomas metaplásicos com os piores tempos de sobrevivência (uma mediana de apenas 3 meses e com 100% de mortalidade em 6 meses), seguidos dos carcinomas micropapilares (sobrevivência mediana de 4 meses).

O CEM apresentou os melhores tempos de sobrevivência. No final do período de seguimento, 67% das gatas estavam vivas. Dos 6 casos analisados, só 2 gatas (33,3%) morreram, uma por complicações anestésicas após a cirurgia e outra por doença oncológica.

Esta última gata apresentava um carcinoma de grau III com metástases ganglionares na altura da exérese.

Relativamente ao carcinoma ductal, verificámos diferenças entre o carcinoma papilar não invasor (CDIS) e os invasores (CDI-STE): a gata com CDIS permanecia viva e livre de doença oncológica no fim do período de estudo mas, apenas 13% das gatas com CDI estavam vivas no final do mesmo período.

Grau histológico e grau nuclear

A sobrevivência total associou-se com o grau histológico ($p<0,0001$). Salientaram-se as gatas com carcinomas de grau III com uma sobrevivência mediana de apenas 6 meses, enquanto nas gatas com carcinomas de grau I a mediana foi de 36 meses (fig. 80).

Obtivemos uma significativa diminuição dos tempos de sobrevivência total com o aumento do grau nuclear ($p=0,009$), que foi de apenas 7 meses nas gatas com carcinomas de grau nuclear 3 (fig. 2 do anexo VIII).

Estadio

Observou-se uma diminuição dos tempos de sobrevivência total com o aumento do estadio ($p<0,0001$), tendo-se salientado os carcinomas de estadio III/IV, com os piores tempos de sobrevivência (fig. 81).

Ulceração, Necrose e Invasão

Estes parâmetros não se associaram com a sobrevivência total. Porém, verificámos que as gatas com carcinomas ulcerados, com necrose e/ou invasão extensa, apresentaram piores tempos de sobrevivência.

Permeação vascular e metastização dos gânglios linfáticos regionais

A associação entre a sobrevivência total e a permeação vascular traduziu-se nas diferenças de sobrevivência mediana, que foi de 36 meses nas gatas cujos carcinomas não apresentavam permeação vascular e de 7 meses nas gatas com tumores com êmbolos ($p=0,0001$; fig. 82). Todas as gatas com metástases ganglionares morreram no período de 9 meses ($p<0,0001$; fig. 83).

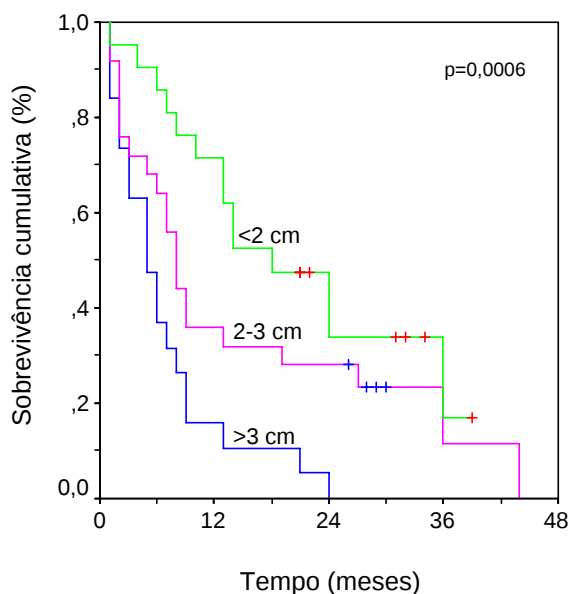


Fig. 78. Associação da sobrevivência total com o tamanho dos carcinomas.

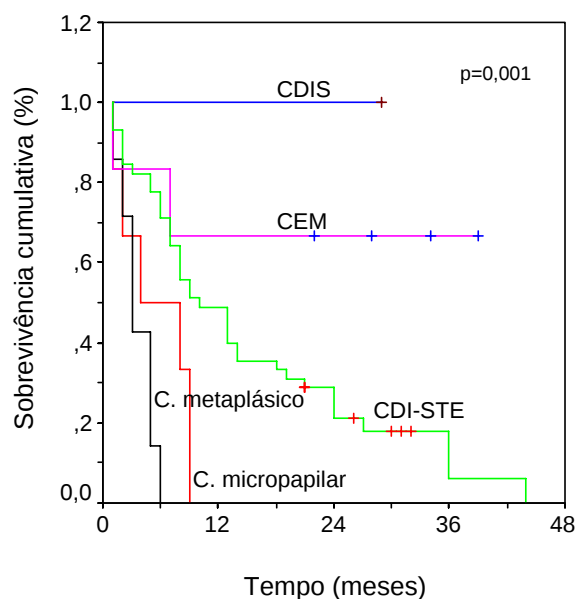


Fig. 79. Associação da sobrevivência total com o tipo histológico dos carcinomas.

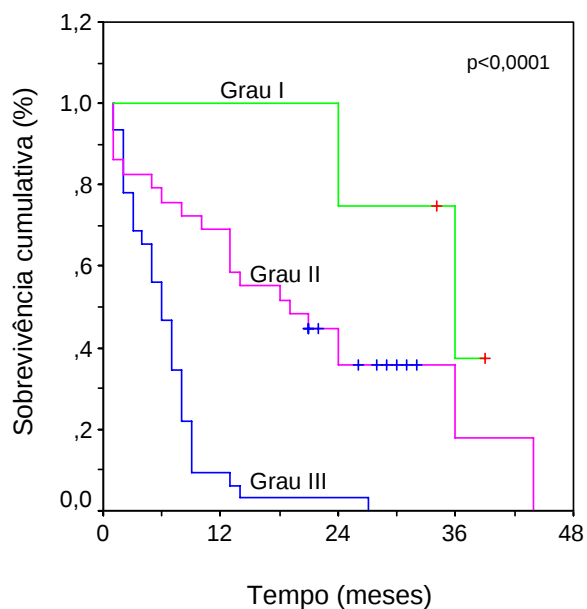


Fig. 80. Associação da sobrevivência total com o grau histológico.

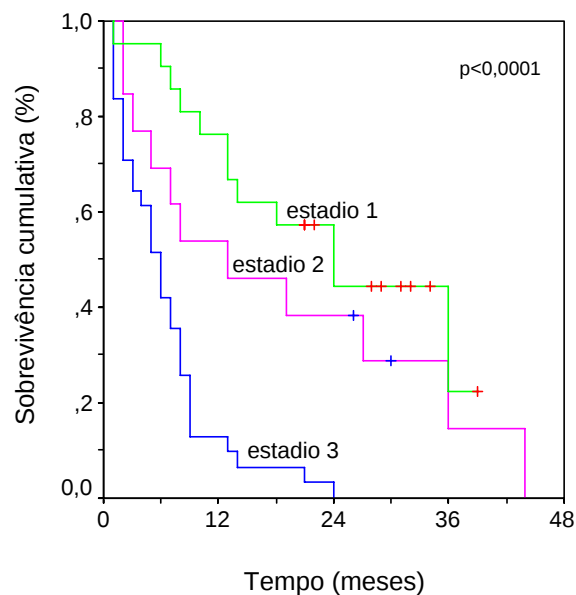


Fig. 81. Associação da sobrevivência total com o estadiamento.

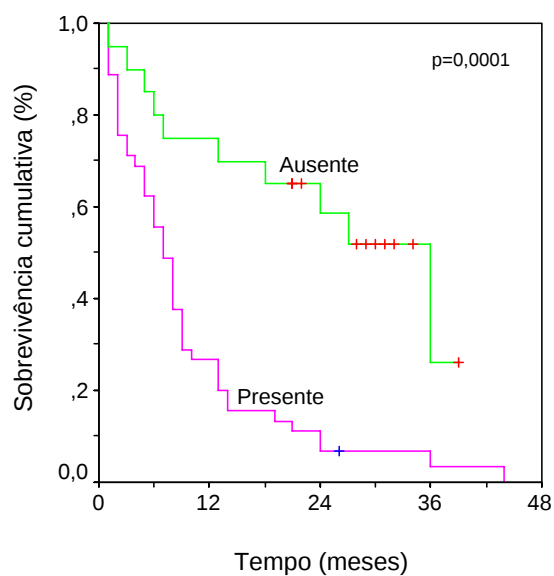


Fig. 82. Associação da sobrevivência total com a permeação vascular.

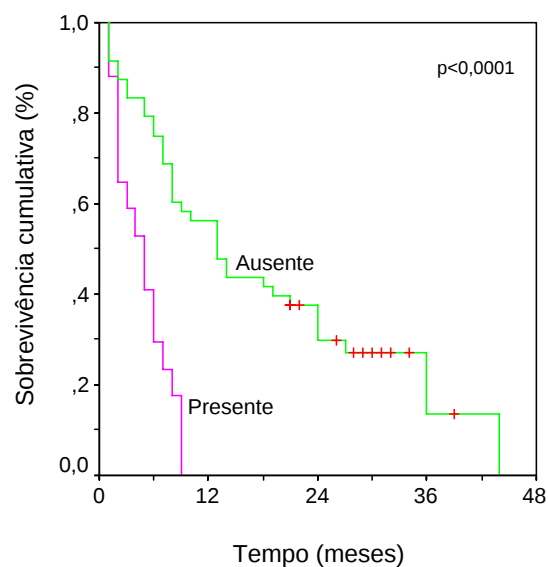


Fig. 83. Associação da sobrevivência total com a metastização dos gânglios regionais.

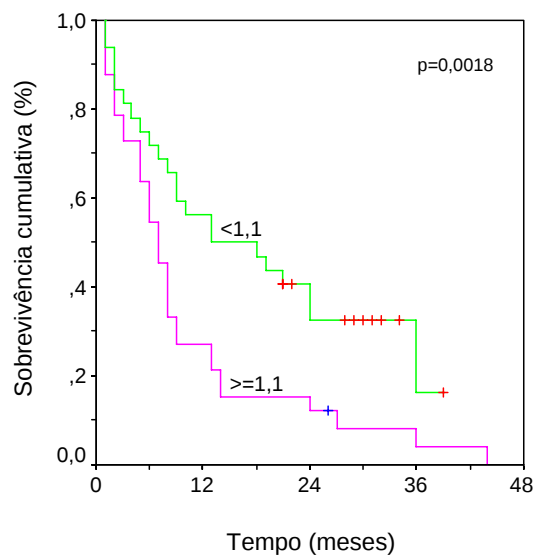


Fig. 84. Associação da sobrevivência total com o índice mitótico.

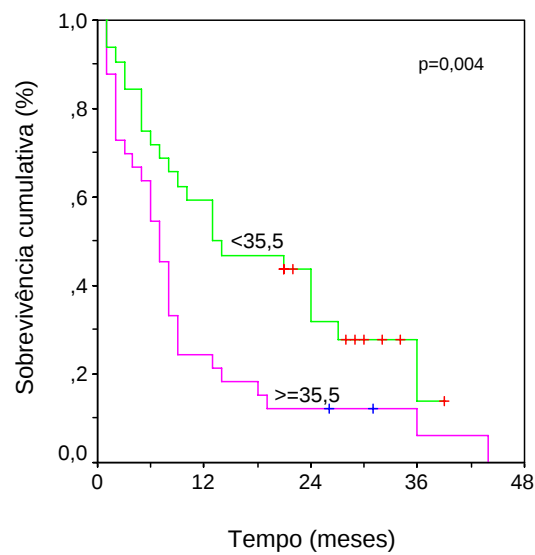


Fig. 85. Associação da sobrevivência total com o índice de Ki-67.

Índice mitótico e de Ki 67

Para avaliar o efeito dos índices de proliferação na sobrevivência, os carcinomas foram divididos em muito ou pouco proliferativos em função do valor da mediana dos índices mitótico e de Ki-67 (quadro 27).

Quadro 27. Divisão dos carcinomas em muito e pouco proliferativos.

	Índice mitótico		Índice de Ki-67	
	Baixo (<1,1)	Alto (≥1,1)	Baixo (<35,5)	Alto (≥35,5)
n (%)	32 (49,2)	33 (50,8)	32 (49,2)	33 (50,8)

A sobrevivência total associou-se de forma significativa com os índices mitótico e de Ki-67 (fig. 84 e 85), sendo menor nas gatas com carcinomas muito proliferativos ($p=0,0018$ e $p=0,006$, respectivamente).

Caderina E

A Caderina E não se associou com a sobrevivência total mas, verificámos que as gatas cujos tumores apresentaram expressão de Caderina E inferior a 25% apresentaram uma sobrevivência mediana muito baixa (5 meses).

MMP1, MMP2, TIMP1 e VEGF

A sobrevivência total também não se associou com estes marcadores mas, as gatas com carcinomas com índices de imunorreactividade altos apresentaram piores tempos de sobrevivência.

HER-2/neu

Apesar de não ter atingido significado estatístico, as gatas com carcinomas positivos ao HER-2 evidenciaram piores tempos de sobrevivência total: aos 12 meses 44% das gatas com tumores negativos estavam vivas mas, apenas 25% das gatas com tumores positivos permaneciam vivas.

II. SOBREVIVÊNCIA LIVRE DE DOENÇA (SLD)

Das 65 gatas submetidas ao estudo de sobrevivência total, 14 foram excluídas por falta de informação relativa à sobrevivência livre de doença e 11 gatas por nunca terem estado livres de doença oncológica após a cirurgia. A análise da sobrevivência livre de doença é assim relativa a 40 animais.

Durante o período de estudo, 34 gatas (85%) desenvolveram doença oncológica. O tempo mediano de sobrevivência livre de doença foi de 8 meses.

ASSOCIAÇÃO ENTRE A SOBREVIVÊNCIA LIVRE DE DOENÇA E OS PARÂMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS E IMUNO-HISTOQUÍMICOS

No quadro 28 apresentamos as associações entre as características clínico-patológicas e a sobrevivência livre de doença. Da sua análise verificámos que os melhores indicadores de prognóstico foram a idade ($p=0,006$), o estadio ($p=0,001$), o tipo histológico ($p=0,002$), o grau histológico ($p=0,0001$), o grau nuclear ($p=0,0046$), a permeação vascular e a ocorrência de metástases ganglionares na altura da exereze ($p=0,0014$ e $p=0,0003$, respectivamente) e o índice mitótico ($p=0,029$).

Idade e tamanho

Verificou-se uma diminuição do tempo de sobrevivência livre de doença com o aumento da idade ($p=0,006$; fig. 3 do anexo VIII), o que é particularmente evidente no grupo de gatas com idade superior a 11 (sobrevivência mediana de 5 meses). A sobrevivência livre de doença também diminuiu de forma marcada nas gatas com carcinomas de dimensão superior a 3 cm (mediana de 3 meses) ($p=0,026$; fig. 86).

Tipo histológico

Relativamente a este parâmetro salientaram-se os carcinomas metaplásicos e os micropapilares com os piores tempos de sobrevivência livre de doença (mediana 3 meses) e, por oposição, os CEM com valores elevados (31 meses). A gata com carcinoma papilar *in situ* (CDIS) permanecia livre de doença oncológica no fim do período de estudo, embora no mesmo período apenas 10% das gatas com CDI permanecessem sem evidências de doença oncológica ($p=0,02$; fig. 87).

Quadro 28. Análise univariada da sobrevivência livre de doença e sua associação com as variáveis clínico-patológicas e imuno-histoquímicas.

Variáveis	n	Sobrevivência cumulativa		Tempo mediano de SLD (meses)	p
		Aos 12 meses n (%)	No fim do período de seguimento n (%)		
Idade (anos)					
<8	4	2 (50,0)	1 (25,0)	12	0,006
8-11	20	10 (50,0)	5 (25,0)	12	
>11	15	1 (6,7)	0 (0,0)	5	
Tamanho (cm)					
<2	16	6 (37,5)	3 (18,8)	10	0,026
2-3	16	8 (50,0)	3 (18,8)	12	
>3	8	0 (0,0)	0 (0,0)	3	
Ulceração					
Ausente	29	12 (41,4)	6 (20,7)	10	0,40
Presente	11	2 (18,2)	0 (0,0)	7	
Tipo histológico					
CDIS	1	1 (100,0)	1 (100,0)	--	0,02
CEM	5	4 (80,0)	2 (40,0)	31	
CDI-STE	29	9 (31,0)	3 (10,3)	10	
C. metaplásico	3	0 (0,0)	0 (0,0)	3	
C micropapilar	2	0 (0,0)	0 (0,0)	3	
Grau histológico (n=39)					
Grau I	2	2 (100,0)	1 (50,0)	31	<0,0001
Grau II	20	10 (50,0)	5 (20,0)	12	
Grau III	17	1 (5,9)	0 (0,0)	4	
Grau nuclear					
Grau 2	15	9 (60,0)	3 (20,0)	14	0,0057
Grau 3	25	5 (20,0)	3 (12,0)	5	
Estadio					
I	17	8 (47,1)	5 (29,4)	12	0,001
II	11	6 (54,6)	1 (9,1)	14	
III/IV	12	0 (0,0)	0 (0,0)	3	
Necrose					
Ausente	2	2 (100,0)	1 (50,0)	14	0,10
Células isoladas	3	2 (66,7)	2 (66,7)	--	
Extensa	35	10 (28,6)	4 (11,4)	7	
Invasão					
Ausente	1	2 (100,0)	2 (100,0)	--	0,20
Estroma	24	10 (41,7)	4 (16,7)	12	
Muscular	15	3 (20,0)	1 (6,7)	7	
Diferenciação epidermóide					
Ausente					0,31
Presente	8	4 (50,0)	2 (25,0)	11	
	32	10 (31,3)	4 (12,5)	7	
Padrão de crescimento					
Expansivo	14	5 (35,7)	3 (21,4)	7	0,77
Infiltrativo	26	9 (34,6)	3 (11,5)	8	
Permeação vascular					
Ausente	16	10 (62,5)	6 (37,5)	14	0,0014
Presente	24	4 (16,7)	0 (0,0)	6	
Metástase ganglionar					
Ausente	34	14 (41,2)	6 (17,6)	12	0,0003
Presente	6	0 (0,0)	0 (0,0)	2	
Índice mitótico					
Baixo (<1,1)	21	10 (47,6)	6 (28,6)	12	0,017
Alto (≥1,1)	19	4 (21,1)	3 (0,0)	6	

Quadro 28 (continuação). Análise univariada da sobrevivência livre de doença e sua associação com as variáveis clínico-patológicas e imuno-histoquímicas.

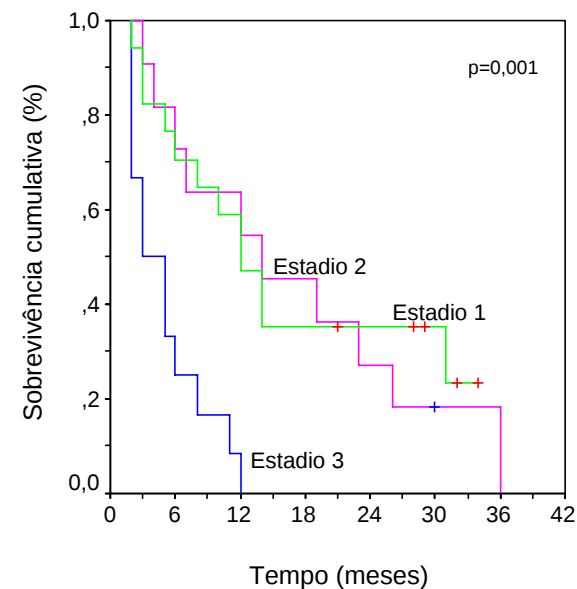
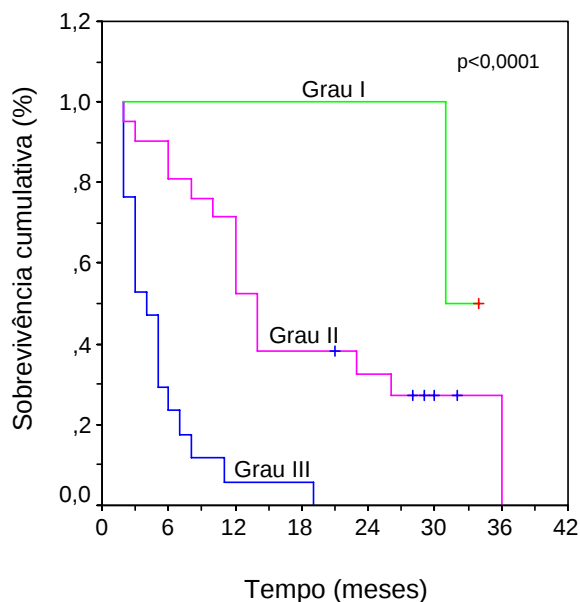
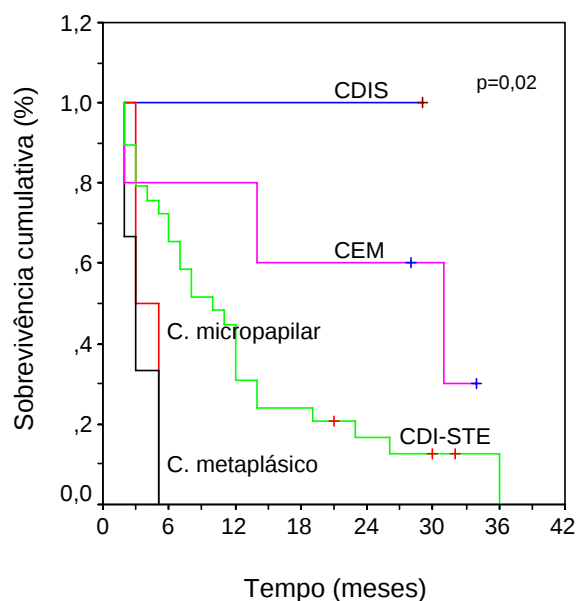
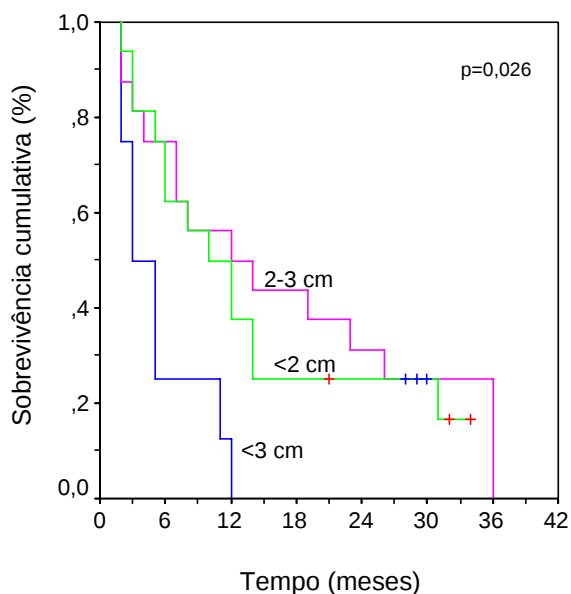
Variáveis	n	Sobrevivência cumulativa		Tempo mediano de SLD (meses)	p
		Aos 12 meses n (%)	No fim do período de seguimento n (%)		
Índice de Ki 67					
Baixo (<35,5)	23	10 (43,5)	6 (26,1)	12	0,35
Alto (≥35,5)	14	4 (23,5)	0 (0,0)	7	
Caderina E					
Preservada	13	6 (46,2)	3 (23,1)	12	0,17
Diminuída	27	8 (29,6)	3 (11,1)	8	
β-Catenina					
Preservada	13	4 (30,8)	2 (15,4)	6	0,70
Diminuída	27	10 (37,0)	4 (14,8)	11	
MMP 1					
Baixo	9	5 (55,6)	3 (33,3)	19	0,10
Alto	31	9 (29,0)	3 (9,7)	7	
MMP 2					
Baixo	5	3 (60,0)	2 (40,0)	31	0,15
Alto	35	11 (31,4)	4 (11,4)	8	
TIMP 1					
Baixo	20	8 (40,0)	4 (20,0)	10	0,40
Alto	20	6 (30,0)	2 (10,0)	7	
VEGF					
<3	9	5 (55,6)	3 (33,3)	14	0,17
≥3	31	9 (29,0)	3 (9,7)	7	
HER-2/neu					
Negativo	34	12 (35,3)	6 (17,7)	10	0,19
Positivo	6	2 (33,3)	0 (0,0)	5	

Grau histológico e grau nuclear

O grau histológico apresentou uma associação significativa com a sobrevivência livre de doença ($p < 0,0001$; fig. 88). A mediana de sobrevivência foi de apenas 4 meses para as gatas com tumores de grau III, e de 31 meses nas gatas com tumores de grau I. O grau nuclear também evidenciou uma relação inversa com o tempo de sobrevivência livre de doença ($p = 0,0057$; fig. 4 do anexo VIII)

Estadio

Relativamente a este parâmetro constatámos que as gatas com carcinomas em estadio 3 evidenciaram os piores tempos de sobrevivência ($p = 0,001$; fig. 89).



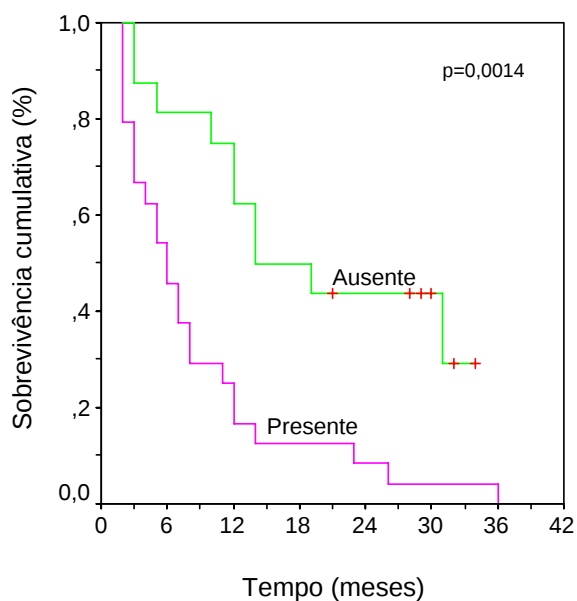


Fig. 90. Associação da sobrevivência livre de doença com a permeação vascular.

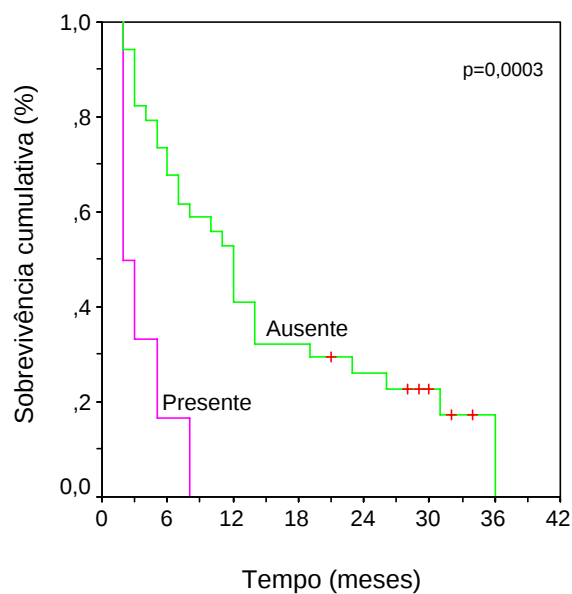


Fig. 91. Associação da sobrevivência livre de doença com a metastização ganglionar.

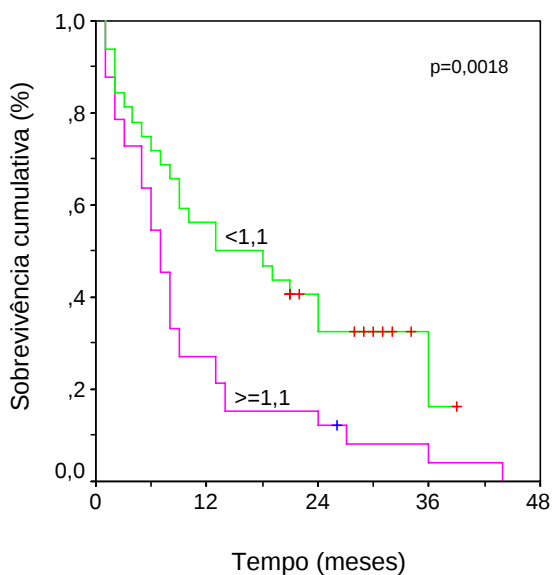


Fig. 92. Associação da sobrevivência livre de doença com o índice mitótico.

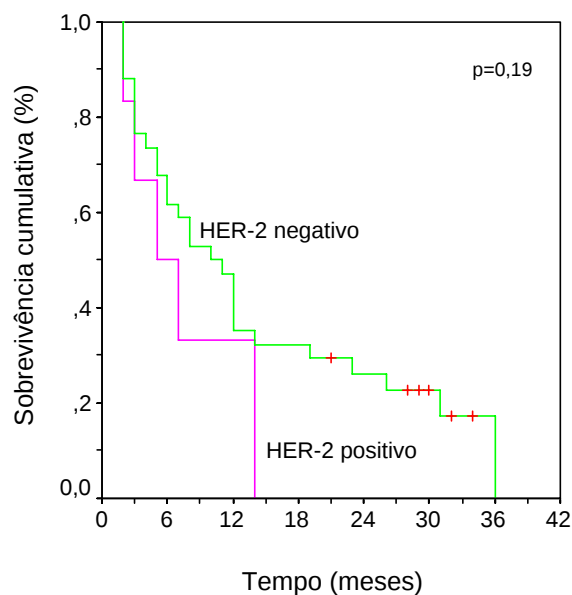


Fig. 93. Associação da sobrevivência livre de doença com a expressão de HER-2/neu.

Permeação vascular e metastização dos gânglios linfáticos regionais

A associação com estes parâmetros foi muito significativa ($p=0,0014$ e $p=0,0003$, respectivamente; fig. 90 e 91), e traduziu-se na diminuição do tempo de sobrevivência livre de doença que, nos carcinomas com permeação linfática, foi metade do obtido nas gatas cujos carcinomas não apresentaram permeação; as gatas com carcinomas metastásicos também evidenciaram valores de sobrevivência muito baixos (mediana de 2 meses).

Índice mitótico e de Ki-67

A sobrevivência livre de doença apresentou associação significativa com o índice mitótico ($p=0,017$; fig. 92) mas não com o índice de Ki-67 ($p=0,35$). Todavia verificámos que as gatas com tumores com índice de Ki-67 alto apresentaram valores medianos de sobrevivência livre de doença menores que as gatas com tumores de índice baixo.

MMP1, MMP2, TIMP1 e VEGF

A sobrevivência mediana das gatas com índices de imunorreactividade baixos foi superior ao das gatas com índices altos, contudo, não se atingiu significado estatístico.

HER-2/neu

A mediana da sobrevivência livre de doença das gatas negativas ao HER-2/neu foi o dobro das gatas positivas, apesar de não ter atingido significado estatístico (fig. 93).

III. ANÁLISE MULTIVARIADA DA SOBREVIVÊNCIA

Para determinar quais os factores com efeito prognóstico independente foi efectuado o estudo multivariado através do teste de Regressão de Cox. Foram analisados todos os parâmetros clínico-patológicos que se associaram com a sobrevivência total na análise univariada Kaplan-Meier, bem como o padrão de crescimento, a ocorrência de necrose e de invasão.

De entre estes parâmetros evidenciaram-se dois com valor de prognóstico independente relativamente à **sobrevivência total**: o grau histológico e a existência de metástases ganglionares no momento de exérese (quadro 29).

Quadro 29. Análise multivariada relativa à sobrevivência total.

Covariável	Sobrevivência total		p
	Hazard ratio	95% CI	
Grau histológico			
Grau II	1		
Grau III	9,20	1,70-50,20	0,01
Metástases			
Ausente	1		0,002
Presente	3,30	1,60-6,90	

(CI: Intervalo de confiança)

O grau histológico alto revelou ser um factor de risco de morte por carcinoma da mama: as gatas com carcinomas de grau II apresentaram um risco de morrerem de doença oncológica 3,3 vezes mais elevado que as gatas com carcinomas de grau I, mas esta diferença não atingiu significado estatístico ($p=0,14$). Contudo, as gatas com carcinomas de grau III evidenciaram um incremento no risco de morte de 9 vezes relativamente às gatas com carcinomas de grau II ($p=0,01$).

A existência de metástases nos gânglios linfáticos regionais no momento da excisão aumenta 3 vezes o risco das gatas morrerem de carcinoma relativamente às gatas sem metástases ($p=0,002$).

Relativamente à *sobrevivência livre de doença* foram factores de prognóstico independente o tamanho, o grau histológico alto e a permeação vascular (quadro 30).

Gatas com carcinomas de grau III evidenciam um aumento muito significativo de risco de desenvolver doença oncológica (26,5 vezes) relativamente às gatas com carcinomas de grau II ($p=0,007$). A presença de êmbolos vasculares aumentou também o risco 5 vezes ($p=0,003$). Também os carcinomas de dimensão superior a 2 cm se associam a um aumento (ligeiro) do risco de desenvolver doença oncológica.

Quadro 30. Análise multivariada relativa à sobrevivência livre de doença.

Covariável	Sobrevivência livre de doença		p
	Hazard ratio	95% CI	
Tamanho (cm)			
<2	1		
2-3	0,2	0,7-0,6	0,002
>3	0,3	0,9-1,05	0,059
Grau histológico			
Grau II	1		0,007
Grau III	26,5	2,4-289,2	
Permeação vascular			
Ausente	1		0,003
Presente	5,1	1,7-14,9	

IV. ESTUDO DE SOBREVIVÊNCIA EM GATAS COM GÂNGLIOS LINFÁTICOS NEGATIVOS (N₀)

Das 72 gatas sem envolvimento ganglionar regional na altura da excisão cirúrgica (gânglios negativos), houve informação acerca da sobrevivência total em 48 casos e da sobrevivência livre de doença em 34. Os resultados da análise univariada da sobrevivência total e livre de doença encontram-se nos quadros 1 e 2 e figuras 5 a 12 no anexo VIII.

Relativamente à **sobrevivência total**, os melhores indicadores de prognóstico foram o tamanho da lesão ($p=0,0041$), o tipo histológico ($p=0,001$; fig. 94), o grau histológico ($p<0,0001$), o grau nuclear ($p=0,0022$), o estadió ($p=0,0036$), a permeação vascular ($p=0,0021$) e os índices mitótico ($p=0,017$) e de Ki-67 ($p=0,049$).

Em relação à **sobrevivência livre de doença**, os melhores indicadores foram o tipo histológico ($p=0,0086$), o grau histológico ($p<0,0001$; fig. 95), o grau nuclear ($p=0,03$) e a permeação vascular ($p=0,0095$). O tamanho da lesão ($p=0,04$) e a idade das gatas ($p=0,018$) também foram importantes.

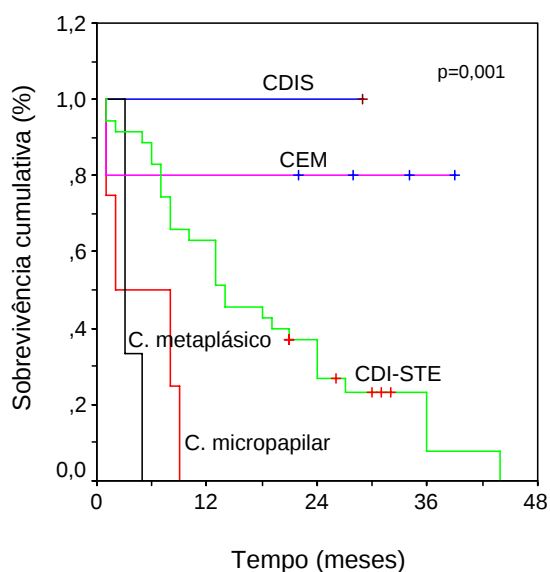


Fig. 94. Associação da sobrevivência total com o tipo histológico em gatas N₀.

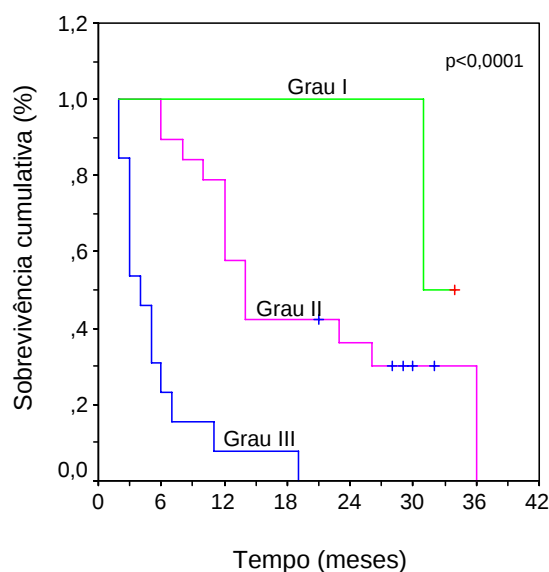


Fig. 95. Associação da sobrevivência livre de doença com o grau histológico em gatas N₀.

Todas as gatas com carcinomas N₀ que apresentavam carcinomas metaplásicos e micropapilares, carcinomas de grau III e com permeação vascular evidenciaram valores de sobrevivência, total e livre de doença, muito baixos. Observou-se ainda a tendência das gatas com carcinomas positivos ao HER-2 apresentarem piores tempos de sobrevivência, total e livre de doença.

ANÁLISE MULTIVARIADA DA SOBREVIVÊNCIA TOTAL EM GATAS N₀

A análise multivariada em gatas N₀ revelou a existência de 2 factores de prognóstico independentes para a sobrevivência total, o grau histológico e o tipo histológico (quadro 31). A regressão de Cox não foi efectuada para a sobrevivência livre de doença devido ao reduzido número de casos.

O grau histológico alto foi novamente um factor de risco de morte por cancro de mama. Gatas com carcinomas de grau II apresentaram risco de morrer 2 vezes superior às gatas com carcinomas de grau I ($p=0,54$). As gatas com carcinomas de grau III apresentaram um risco 9 vezes maior de morrerem que as gatas com carcinomas de grau II ($p=0,015$).

As gatas com carcinomas metaplásico evidenciaram risco de morte por cancro de mama 4 vezes superior ao das gatas com CDI-STE ($p=0,043$). Também as gatas com carcinomas micropapilares evidenciaram risco muito aumentado de morte por cancro (6 vezes) relativamente ao carcinoma metaplásico ($p=0,009$).

Quadro 31. Análise multivariada relativa à sobrevivência total em gatas N₀.

Co-variável	Sobrevivência total		p
	Hazard ratio	95% CI	
Grau histológico			
Grau II	1		0,015
Grau III	8,5	1,5-47,9	
Tipo histológico			
CDI-STE	1		0,043
C. metaplásico	4,4	1,05-18,7	
C. micropapilar	6,1	1,6-23,2	0,009

7. ANÁLISE DO CONTEÚDO DE ADN POR CITOMETRIA DE IMAGEM

I. CARCINOMAS

O conteúdo de ADN foi estudado na totalidade da amostra (n=94) de carcinomas a que nos referimos previamente. Obtivemos histogramas interpretáveis em 93 dos casos (99%), tendo sido excluído um CEM por impossibilidade de efectuar a sua avaliação por deficiente preservação do material. Conforme referido em Material e Métodos, os histogramas de ADN foram classificados em diplóides, aneuplóides e multiplóide de ADN.

PLOIDIA DE ADN

Os resultados da ploidia de ADN dos carcinomas analisados encontram-se sumariados no quadro 1 do anexo IX.

Dois terços dos carcinomas (62/93) apresentaram conteúdo de ADN anómalo: 34 (37%) eram aneuplóides (fig. 96) e 28 (30%) multiplóides de ADN. Ao contrário da maioria dos CEMs que apresentou conteúdo de ADN diplóide (n=4; 57%; fig. 97), a maioria dos outros tipos histológicos apresentou conteúdo aberrante. Salientou-se o carcinoma metaplásico com a frequência mais elevada do padrão multiplóide de ADN (fig. 98).

Apenas um CEM (14%) apresentou conteúdo de ADN multiplóide. Era uma proliferação bifásica associada a áreas de carcinoma micropapilar, com metástases ganglionares. Quando avaliámos separadamente o conteúdo de ADN das duas áreas tumorais verificámos que o carcinoma bifásico era diplóide com células verdadeiramente aneuplóides (5c) e o micropapilar era multiplóide de ADN, que determinou o resultado do tumor no seu conjunto.

O carcinoma papilar *in situ* apresentou conteúdo de ADN diplóide.

ASSOCIAÇÃO DA PLOIDIA DE ADN COM OS CRITÉRIOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS E IMUNO-HISTOQUÍMICOS

A ploidia de ADN só se associou de forma significativa com os graus histológico e nuclear. Contudo, observámos tendências que descrevemos em seguida:

Grau histológico e grau nuclear

O aumento do grau histológico (fig. 99) e nuclear associou-se com o aparecimento de vários clones aneuplóides. Nenhum carcinoma de Grau I era multiplóide mas 50% (20/40) dos de Grau III possuía ADN multiplóide ($p=0,003$; fig. 100 e 101). A maioria dos carcinomas de grau nuclear 3 era multiplóide ($p<0,0001$).

Ulceração cutânea, necrose e invasão

A ulceração foi mais frequente em tumores com conteúdo de ADN anómalo. A extensão da necrose e da invasão associou-se com o conteúdo aberrante de ADN: todos os carcinomas multiplóides evidenciaram extensos focos de necrose e invadiram frequentemente o músculo. Os carcinomas não invasores eram diplóides de ADN.

Permeação vascular e metastização nos gânglios linfáticos regionais

Ocorreram preferencialmente em carcinomas com ADN anómalo, em particular nos multiplóides de ADN.

Estadio

O aumento do estadio associou-se com um conteúdo aberrante de ADN, principalmente do padrão multiplóide; 50% dos carcinomas multiplóides de ADN eram lesões de estadio 3 e apenas 18% ($n=5$) eram de estadio 1.

ASSOCIAÇÃO DA PLOIDIA DE ADN COM OS ÍNDICES DE PROLIFERAÇÃO

A ploidia de ADN associou-se de forma significativa com o índice mitótico. Relativamente ao índice de Ki-67, observa-se a tendência ao aumento deste índice nos carcinomas com ADN anómalo, em particular nos multiplóides (fig. 102 e 103; quadro 2 do anexo IX).

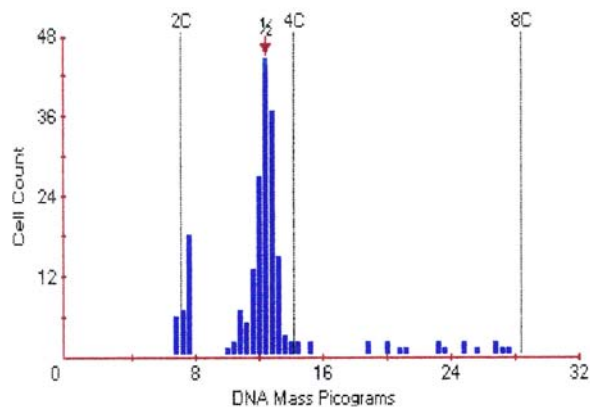


Fig. 96. Histograma aneuplóide de ADN.

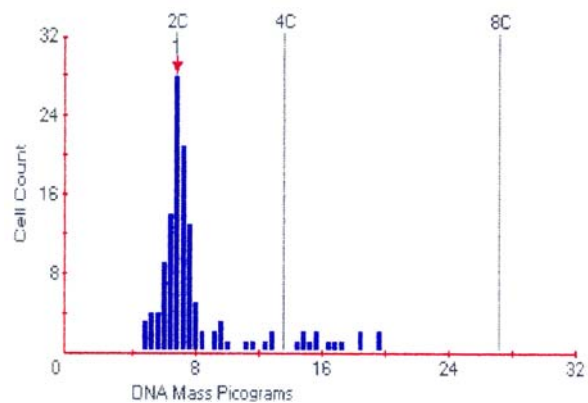


Fig. 97. Histograma diplóide de ADN.

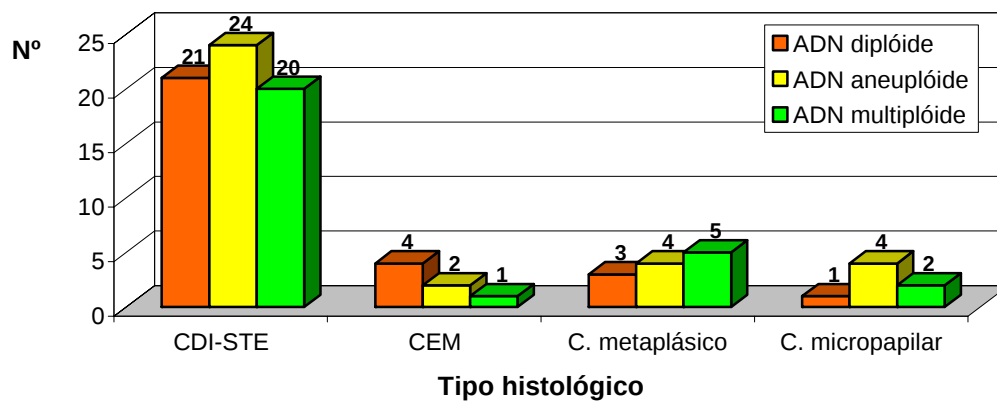


Fig. 98. Associação entre a ploidia de ADN e o tipo histológico.

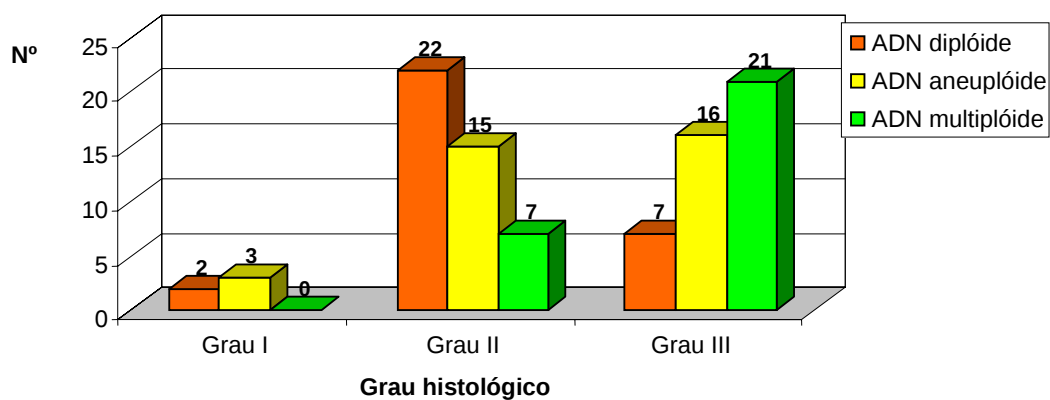


Fig. 99 Associação da ploidia de ADN e o grau histológico (p=0,003)

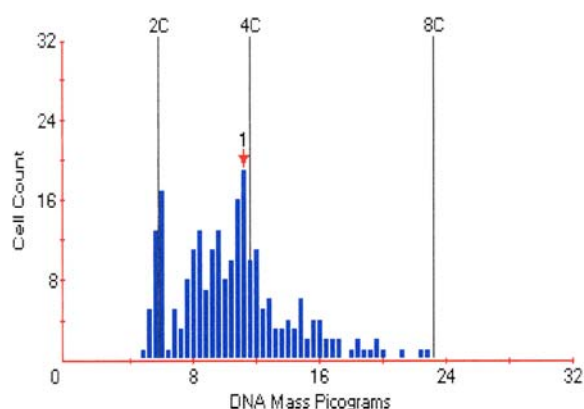


Fig. 100. Histograma multiploide de ADN.

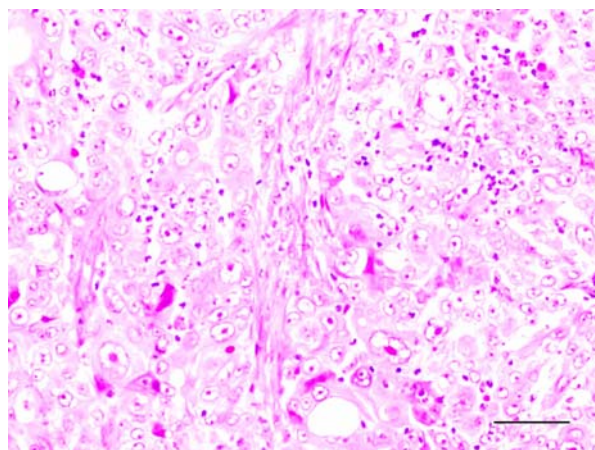


Fig. 101. Carcinoma de alto grau com conteúdo de ADN multiploide. Estalão = 60 µm.

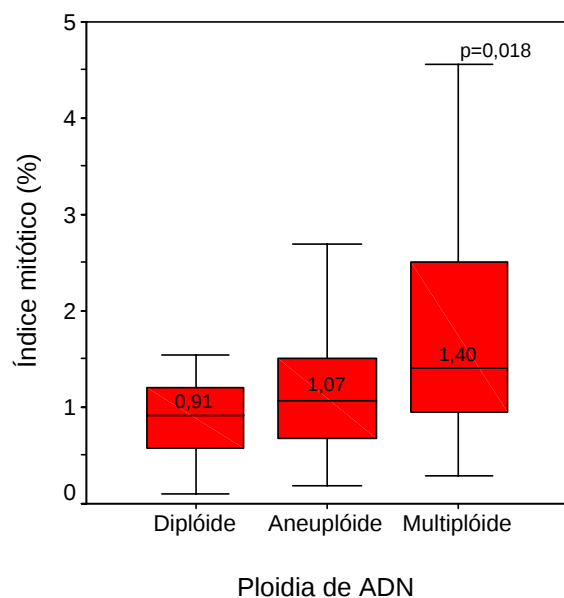


Fig. 102. Associação entre a ploidia de ADN e o índice mitótico.

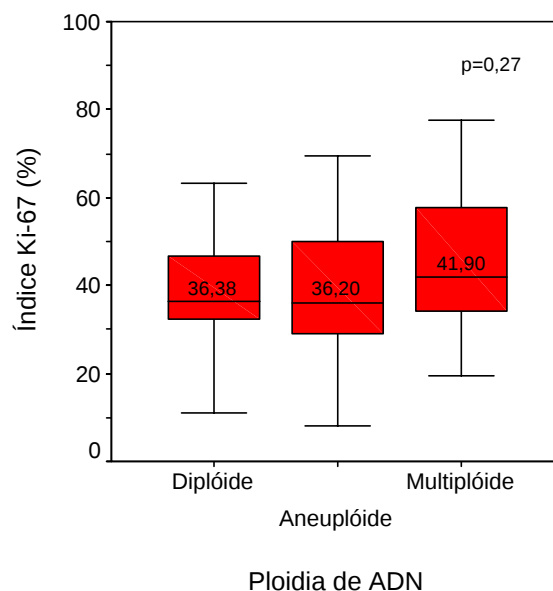


Fig. 103. Associação entre a ploidia de ADN e o índice de Ki-67.

ASSOCIAÇÃO DA PLOIDIA DE ADN COM AS VARIÁVEIS IMUNO-HISTOQUÍMICAS

Caderina E e β -Catenina

Observou-se a perda progressiva de caderina E com a alteração da ploidia ($p=0,014$), contudo, em relação à β -Catenina não se observaram diferenças significativas.

MMP1, MMP2, TIMP1 e VEGF

Todas as classes de ploidia evidenciaram índices de imunoreactividade elevados destes marcadores. Os tumores multiplóides de ADN evidenciam-se por apresentarem expressão aumentada de MMP1 e VEGF, relativamente às outras classes de ploidia.

FRACÇÃO DE CÉLULAS VERDADEIRAMENTE ANEUPLOÍDES (5cER)

A existência de células verdadeiramente aneuplóides (5cER) associou-se de forma significativa com o conteúdo de ADN aberrante ($p < 0,0001$): células com conteúdo acima de 5c estavam presentes em 97% dos carcinomas aneuplóides de ADN e em 100% dos multiplóides de ADN. Quando analisámos o valor percentual da fracção 5cER (quadro 32) observámos que os carcinomas com ADN aberrante apresentaram mais frequentemente 5cER alta, superior a 1%.

Quadro 32. Fracção 5cER e ploidia de ADN.

	Ploidia de ADN			p
	ADN diplóide n (%)	ADN aneuplóide n (%)	ADN multiplóide n (%)	
5cER				
0	12 (38,7)	1 (2,9)	0 (0,0)	<0,0001
<1%	10 (32,3)	1 (2,9)	2 (7,1)	
>1%	9 (29,0)	32 (94,1)	26 (92,9)	

Quando relacionámos fracção 5cER com o tipo histológico verificamos que os CEMs apresentaram com menor frequência 5cER alta (43%) enquanto os carcinomas micropapilares e metaplásicos evidenciaram com maior frequência 5cER alta (75% e 92%, respectivamente) (fig. 104). O carcinoma papilar *in situ* não apresentou células com conteúdo acima de 5c ($p=0,0036$).

A fracção 5cER elevada associou-se ainda de forma significativa com o tamanho ($p=0,005$), o grau histológico ($p=0,001$) e nuclear ($p<0,0001$), o estadio ($p=0,005$), a necrose ($p=0,002$) e a invasão, a permeação vascular ($p=0,036$) (quadro 3 do anexo IX; fig. 105), o índice mitótico ($p<0,0001$) (quadro 33). Verificámos ainda que a maioria dos carcinomas com índices de imunoreactividade altos às metaloproteinases da matriz e VEGF, evidenciaram de forma constante fracção 5cER superior a 1%.

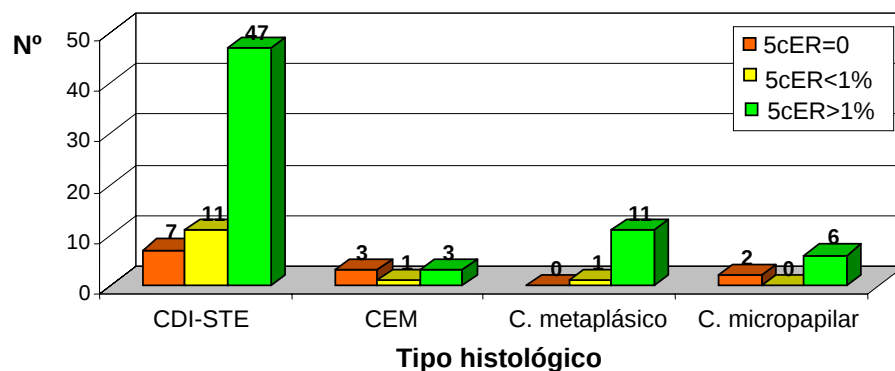


Fig. 104. Associação da fracção 5cER com o tipo histológico.

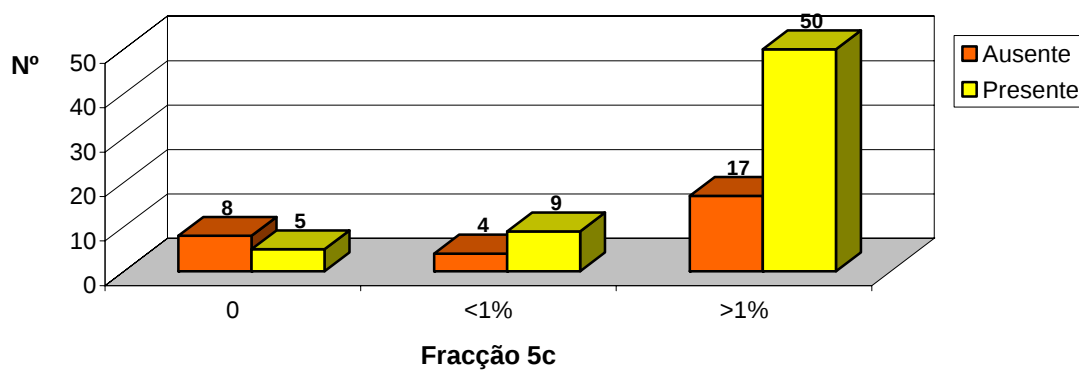


Fig. 105. Associação do valor da fracção 5c com a permeação vascular (p=0,036).

Quadro 33. Associação da fracção 5cER com os índices de proliferação celular.

	Fracção 5cER			p
	0	<1%	>1%	
Índice mitótico (%)				
Mediana	0,65	0,67	1,28	<0,0001
Mínimo-Máximo	0,15-1,26	0,1-1,54	0,19-4,56	
Índice Ki-67 (%)				
Mediana	34,20	35,90	39,50	0,39
Mínimo-Máximo	9,9-72,27	2,20-54,20	8,25-77,70	

II. ESTUDO CITOMÉTRICO DOS TUMORES PRIMÁRIOS E SUAS METÁSTASES

Foram estudados 22 carcinomas metastásicos. A maioria dos tumores primários (n=9; 40,9%) possuía ADN multiploide, 31,8% (n=7) era diplóide e 27% (n=6) aneuploide.

Tal como se verificou com os tumores primários, a maioria das metástases era multiploide (n=12; 54,5%) e apenas 27% (n=6) era diplóide de ADN. Efectivamente a maioria manteve o padrão de ADN do tumor primário (n=13; 59%), apenas 4 carcinomas com conteúdo aberrante (1 multiploide e 2 aneuploides de ADN) desenvolveram metástases diplóides. Cinco carcinomas, 3 diplóides e 2 aneuploides, desenvolveram metástases multiploides de ADN; é de salientar que 3 destes tumores primários apresentavam fracção 5cER alta (superior a 1%) (quadro 34).

Quadro 34. Comparação da ploidia de ADN e fracção 5cER dos tumores primários e secundários.

Parâmetro	Tumor		p
	Primário n (%)	Secundário n (%)	
Ploidia de ADN			
ADN diplóide	7 (31,8)	6 (27,3)	0,70
ADN aneuploide	6 (27,3)	4 (18,2)	
ADN multiploide	9 (40,9)	12 (54,5)	
Fracção 5cER			
5cER=0	3 (13,6)	2 (9,1)	1,00
5cER<1%	3 (13,6)	4 (18,2)	
5cER>1%	16 (72,7)	16 (72,7)	

III. ESTUDO CITOMÉTRICO DA MAMA ADJACENTE AOS CARCINOMAS

Foram analisadas 23 alterações fibroquísticas e 19 CDIS adjacentes aos carcinomas.

Alterações fibroquísticas (AFQs)

Todas as alterações fibroquísticas eram diplóides de ADN e, apenas 2 (8,7%) possuíam células com conteúdo acima de 5c (5cER=0,8%). A maioria encontrava-se na periferia de carcinomas aneuploides (48%). As restantes surgiram na periferia de carcinomas diplóides (30%) e multiploides de ADN (22%).

CDIS

A maioria das lesões de CDIS era diplóide de ADN (n=11; 57,9%) e apresentava fracção 5cER alta (>1%) (quadro 35). A maioria das lesões de CDIS diplóides (8/9; 81%) e

aneuplóides de ADN (3/5; 60%) encontravam-se na periferia de carcinomas diplóides mas, todos os com conteúdo multiplóide (n=5) encontravam-se na periferia de carcinomas com conteúdo de ADN aberrante (40% eram aneuplóides e 60% multiplóides de ADN).

Quadro 35. Comparação da ploidia de ADN dos CDIS com a fracção 5cER.

	CDIS		
	ADN diplóide n (%)	ADN aneuplóide n (%)	ADN multiplóide n (%)
Fracção 5cER			
5cER=0	5 (45,5)	0 (0,0)	0 (0,0)
5cER<1%	1 (9,1)	3 (75,9)	0 (0,0)
5cER>1%	5 (45,5)	1 (25,0)	4 (100,0)

Quando comparámos os dois tipos de lesão descritos para a mama adjacente com a totalidade da série de carcinomas observámos um aumento da frequência de alteração do conteúdo de ADN, traduzido por aumento do padrão aneuplóide e da fracção 5cER (figuras 106 e quadro 36).

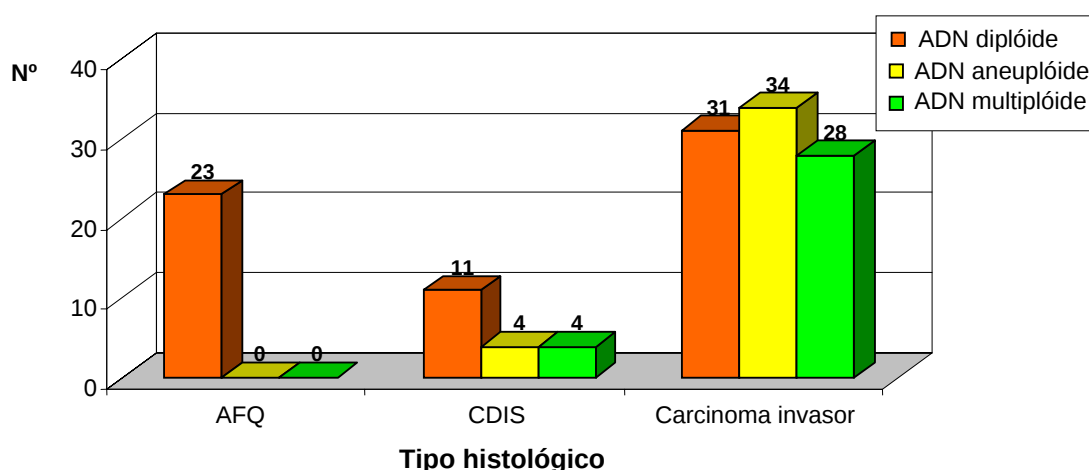


Fig. 106. Ploidia de ADN dos carcinomas e das lesões presentes na sua periferia (p<0,0001).

Quadro 36. Comparação da ploidia de ADN e 5cER entre os carcinomas e as alterações mamárias adjacentes.

Parâmetro	Tipo histológico			p
	AFQ n (%)	CDIS n (%)	Carcinoma n (%)	
Ploidia de ADN				
ADN diplóide	23 (100,0)	11 (57,9)	31 (33,3)	<0,0001
ADN aneuplóide	0 (0,0)	4 (21,1)	34 (36,6)	
ADN multiplóide	0 (0,0)	4 (21,1)	28 (30,1)	
Fracção 5cER				
5cER=0	21 (91,3)	5 (26,3)	13 (14,0)	<0,0001
5cER<1%	2 (8,7)	4 (21,1)	13 (14,0)	
5cER>1%	0 (0,0)	10 (52,6)	67 (72,0)	

IV. ASSOCIAÇÃO DOS PARÂMETROS CITOMÉTRICOS COM A SOBREVIVÊNCIA

Conforme foi referido anteriormente, os dados da sobrevivência total são referentes a 64 gatas e da sobrevivência livre de doença a 39.

Ploidia de ADN

Observámos associações significativas entre a ploidia de ADN e os tempos de sobrevivência, que foram sempre menores nos carcinomas com conteúdo de ADN aberrante, em particular nos multiplóides de ADN (quadro 37, e fig 107 e 108).

Quadro 37. Associação da ploidia de ADN com a sobrevivência.

Ploidia de ADN	n	Sobrevivência cumulativa		Tempo mediano de sobrevivência (meses)	p
		Aos 12 meses	No fim do período de seguimento		
		n (%)	n (%)		
Sobrevivência total					
ADN diplóide	21	11 (57,1)	7 (33,3)	19	0,0048
ADN aneuplóide	21	10 (47,6)	3 (9,5)	9	
ADN multiplóide	22	4 (18,2)	1 (4,6)	5	
Sobrevivência livre de doença					
ADN diplóide	15	8 (53,3)	3 (20,0)	14	0,012
ADN aneuplóide	12	4 (33,3)	2 (16,7)	7	
ADN multiplóide	12	1 (8,3)	1 (8,3)	4	

Fracção 5cER

A fracção 5cER associou-se de forma significativa com a sobrevivência livre de doença mas não com a sobrevivência total. Contudo, os carcinomas com células 5c apresentaram também piores tempos de sobrevivência total (Quadro 38 e fig. 109 e fig 1 do anexo IX).

Quadro 38. Associação da fracção 5cER com a sobrevivência.

Fracção 5cER	n	Sobrevivência cumulativa		Tempo mediano de sobrevivência (meses)	p
		Aos 12 meses	No fim do período de seguimento		
		n (%)	n (%)		
Sobrevivência total					
5cER=0	10	7 (70,0)	5 (50,0)	24	0,29
5cER<1%	8	3 (37,5)	0 (0,0)	6	
5cER>1%	46	16 (34,8)	5 (10,9)	8	
Sobrevivência livre de doença					
5cER=0	6	5 (83,3)	3 (50,0)	31	0,02
5cER<1%	5	2 (40,0)	0 (0,0)	12	
5cER>1%	28	6 (21,4)	3 (10,7)	6	

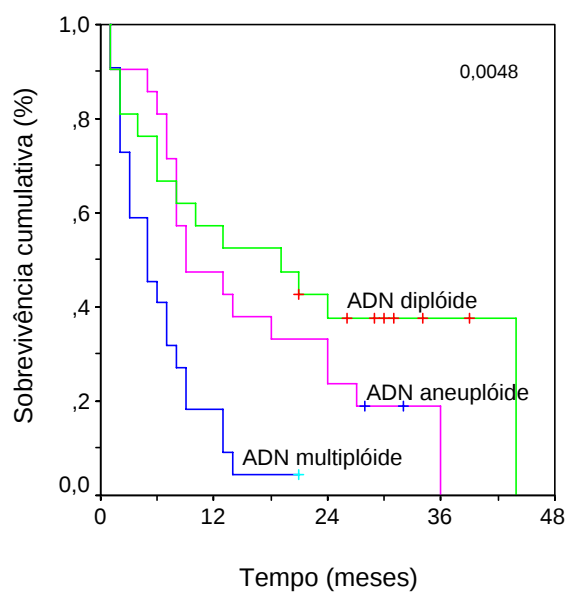


Fig. 107. Associação da ploidia de ADN com a sobrevivência total.

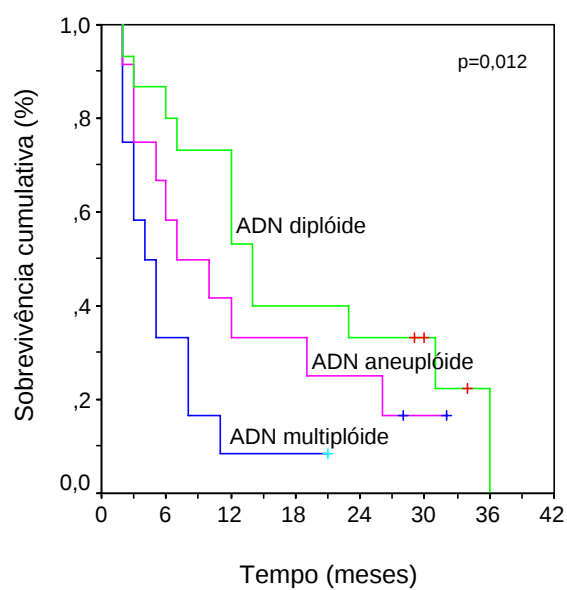


Fig. 108. Associação da ploidia de ADN com a sobrevivência livre de doença.

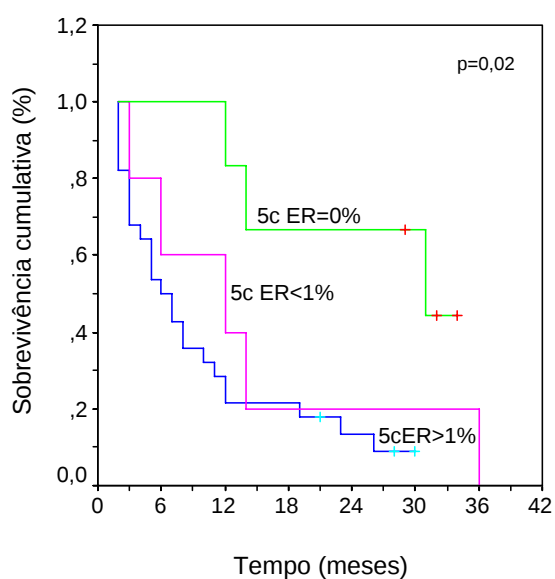


Fig. 109. Associação da fração 5cER com a sobrevivência livre de doença.

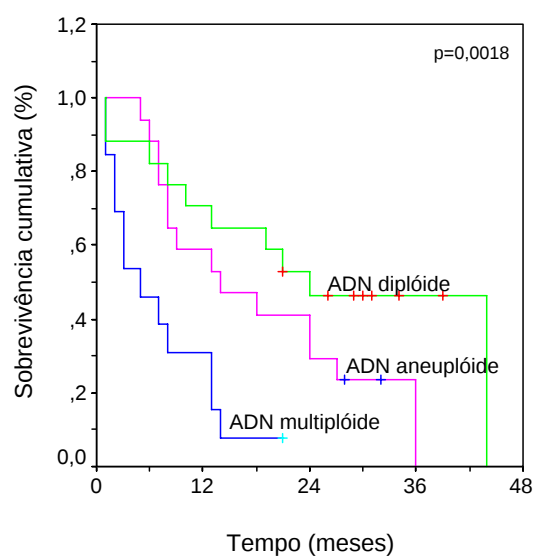


Fig. 110. Associação da sobrevivência total com a ploidia de ADN em gatas N_0 .

Associação da fracção 5cER com a sobrevivência em gatas com carcinomas diplóides

Dos 21 carcinomas diplóides de ADN seguidos no estudo de sobrevivência, 12 apresentaram fracção 5cER. Quando analisámos a sobrevivência neste grupo verificámos que as gatas cujos carcinomas apresentavam fracção 5cER superior a 1% apresentaram piores tempos de sobrevivência (quadro 39).

Quadro 39. Associação da fracção 5cER dos carcinomas diplóides de ADN com a sobrevivência.

Fracção 5cER	n	Sobrevivência cumulativa		Tempo mediano de sobrevivência (meses)	p
		Aos 12 meses	No fim do período de seguimento		
		n (%)	n (%)		
Sobrevivência total					
5cER=0	9	6 (66,7)	4 (44,4)	24	0,78
5cER<1%	6	3 (50,0)	0 (0,0)	10	
5cER>1%	6	3 (50,0)	3 (50,0)	8	
Sobrevivência livre de doença					
5cER=0	5	4 (80,0)	2 (40,0)	31	0,43
5cER<1%	5	2 (40,0)	0 (0,0)	12	
5cER>1%	5	2 (40,0)	1 (20,0)	12	

Associação dos parâmetros citométricos com a sobrevivência em gatas N₀

A sobrevivência total associou-se com a ploidia de ADN ($p=0.0018$), com os carcinomas multiplóides a evidenciarem uma diminuição acentuada do tempo de sobrevivência relativamente às outras classes de ploidia. Observou-se ainda a tendência da diminuição da sobrevivência total com o aumento da fracção 5cER (quadro 40; fig. 110 e fig. 2 do anexo IX).

Quadro 40. Associação dos parâmetros citométricos com a sobrevivência total em gatas N₀.

Variáveis	n	Sobrevivência cumulativa		Tempo mediano de ST (meses)	p
		Aos 12 meses	No fim do período de seguimento		
		n (%)	n (%)		
Ploidia de ADN (n=47)					
Diplóide	17	12 (70.6)	7 (41.2)	24	0.0018
Aneuplóide	17	10 (58.8)	2 (11.8)	14	
Multiplóide	13	4 (30.8)	1 (7.6)	5	
Fracção 5cER (n=47)					
5cER=0	8	7 (87.5)	5 (62.5)	-- (média 28.8)	0.16
5cER<1%	6	3 (50.0)	0 (0.0)	10	
5cER>1%	33	16 (48.5)	5 (15.2)	9	

Relativamente à sobrevivência livre de doença também se observou a tendência da diminuição da sobrevivência com o aumento da alteração da ploidia e da fracção 5c (quadro 41).

Quadro 41. Associação dos parâmetros citométricos com a sobrevivência livre de doença em gatas N₀.

Variáveis	n	Sobrevivência cumulativa		Tempo mediano de SLD (meses)	p
		Aos 12 meses	No fim do período de seguimento		
		n (%)	n (%)		
Ploidia de ADN (n=33)					
Diplóide	14	8 (57.1)	3 (21.4)	14	0.08
Aneuplóide	12	4 (33.3)	2 (16.7)	7	
Multiplóide	7	1 (14.3)	1 (14.3)	5	
Fracção 5cER (n=33)					
5cER=0	6	5 (83.3)	3 (50.0)	31	0.05
5cER<1%	5	2 (40.0)	0 (0.0)	12	
5cER>1%	22	6 (27.3)	3 (13.6)	7	

Análise multivariada

A análise multivariada aplicada à ploidia de ADN e a fracção 5c revelou que estas 2 variáveis citométricas não são, neste estudo, factores de prognóstico independente para a sobrevivência total.

DISCUSSÃO

As neoplasias da glândula mamária representam 12% da totalidade das neoplasias dos felídeos domésticos e 17% das neoplasias das gatas (Rutteman *et al.*, 2001; Misdorp, 2002). Os carcinomas constituem 80-96% dos tumores de mama (Castagnaro 1998 a, b), e são muito agressivos com tendência à recorrência local e à metastização precoce (Theilen e Madewell, 1987; Misdorp *et al.*, 1991; Rutteman *et al.*, 2001). Com base na idade, incidência, factores de risco, prognóstico, padrão metastásico e resposta à terapia, o carcinoma da mama da gata foi proposto como um bom modelo para o cancro de mama da mulher (Zappulli *et al.*, 2005). Estes carcinomas apresentam grande semelhança morfológicas, ao contrário do que acontece com os carcinomas da mama da cadela, que apesar também serem considerados modelo para o estudo da mama da mulher, apresentam quase sempre grande comparticipação do componente mioepitelial.

Neste trabalho foram analisadas 130 nódulos mamários, que foram classificados de acordo com a sua apresentação, comportamento clínico e padrões histológicos em alterações não neoplásicas, neoplasias benignas e malignas.

A mama está constantemente em modificação em resposta à regulação hormonal nomeadamente na puberdade, na gestação e na lactação. Por vezes a mama aumenta originando pseudotumores (Rosai, 1996; Guinebretiere *et al.*, 2005). Alterações não neoplásicas como as fibroquísticas são das alterações mais comuns da mama da mulher (Rosai, 1996; Vogel, 2004; Guinebretiere *et al.*, 2005) e evidenciam pelo menos uma das seguintes alterações: fibrose, adenose, quistos e hiperplasia epitelial (Guinebretiere *et al.*, 2005). Neste estudo, as alterações fibroquísticas corresponderam a 4,6% dos nódulos analisados, mas surgiram também frequentemente na mama adjacente às neoplasias. Na gata são também frequentes as alterações fibroadenomas (também designadas hiperplasia fibroepitelial ou hipertrofia mamária felina), que afectam gatas inteiras, jovens ou gestantes, e/ou submetidas a tratamento com progestagénios. Resultam da proliferação dos ductos mamários e do tecido conjuntivo intralobular em resposta à progesterona, e caracterizam-se pelo crescimento rápido de uma ou várias glândulas mamárias (Moulton, 1990; Jones *et al.*, 1997; Misdorp *et al.*, 1999; de las Mulas *et al.*, 2000b; Rutteman *et al.*, 2001; Loretto *et al.*, 2005). As alterações fibroadenomas corresponderam a 13% da série em estudo.

A maioria das neoplasias analisadas era epitelial, o que está de acordo com outros autores (Brenner *et al.*, 1998; Rutteman *et al.*, 2001). Durante este período de 2 anos apenas observámos um angiossarcoma primário da mama, que será motivo de publicação. Os carcinomas constituíram 72% da totalidade da série analisada e a 88% da totalidade das neoplasias mamárias, frequência que está de acordo com estudos prévios (Castagnaro 1998a, b; Rutteman *et al.*, 2001; Misdorp, 2002).

Toda a série é referente a fêmeas, revelando a existência de uma forte predisposição sexual (Theilen e Madewell, 1987; Moulthon, 1990; Skorupski *et al.*, 2005; Zappulli *et al.*, 2005); durante um período de 6 anos apenas observámos 2 casos em machos submetidos a tratamento com contraceptivos, uma alteração fibroadenomatosa e um carcinoma de grau III.

A raça mais representada foi a Europeu Comum, o que reflecte a população portuguesa de felídeos. A maioria das gatas apresentava idade média a avançada (média 10 anos), observando-se diferenças na idade de aparecimento dos vários tipos histológicos. A maioria das alterações não neoplásicas surgiu em animais mais jovens (media de 4,75 anos), enquanto os carcinomas surgiram em média aos 11 anos. As neoplasias benignas, por seu turno, surgiram em média aos 7,6 anos. A literatura consultada refere os 10-12 anos como a idade média no momento da detecção dos carcinomas (Theilen e Madewell, 1987; Jones *et al.*, 1997; Rutteman *et al.*, 2001; Skorupski *et al.*, 2005). Quando analisámos a distribuição etária por raças verificámos que a maioria das gatas siamesas desenvolveu carcinomas mais cedo, antes dos 11 anos de idade. Alguns estudos referem uma maior predisposição nesta raça, que desenvolve neoplasias mamárias por volta dos 9 anos (Rutteman *et al.*, 2001; Zappulli *et al.* 2005). Salientaram-se as gatas cruzadas com idade mediana de 15,5 anos no momento da excisão dos carcinomas.

A gata possui 2 cadeias mamárias com 4 mamas cada, 2 craneais (axilar e torácica) e 2 caudais (abdominal e inguinal) (Rutteman *et al.*, 2001; Zappulli *et al.*, 2005). A maioria das alterações/lesões analisadas era múltipla, afectando uma ou ambas as cadeias mamárias; surgiram preferencialmente na cadeia mamária esquerda e as mamas caudais, em particular na mama inguinal, o que também foi referido por Holzworth (1987) e Zappulli *et al.* (2005). A ocorrência de tumores múltiplos do mesmo tipo ou de diferentes tipos histológicos está bem documentada na literatura (Theilen e Madewell, 1987; Moulthon, 1990; Misdorp, 2002). Em caso de lesões múltiplas deve sempre considerar-se a possibilidade de envolvimento metastásico por via linfo-hematógena a partir do tumor primário (Misdorp, 2002; Zappulli *et al.*, 2005)

Obtivemos informação acerca do estado reprodutivo e realização de tratamentos contraceptivos em 69 gatas, que foram maioritariamente castradas na altura da excisão dos nódulos mamários. As gatas inteiras apresentam risco de desenvolver neoplasias de mama sete vezes superior ao das gatas castradas (Misdorp e Weijer, 1980; Holzworth, 1987; Moulthon, 1990; Rutteman *et al.*, 2001; Zappulli *et al.*, 2005). O efeito protector da ovariectomia antes do primeiro ano é muito notório na gata (Morrison, 1998; Rutteman *et al.*, 2001; Overley *et al.*, 2005) e, a esterilização em idades avançadas associa-se ao aumento do risco de neoplasias (Jones *et al.*, 1997; Zappulli *et al.*, 2005). Todavia, quando a castração é realizada no momento da excisão dos nódulos mamários não influencia a progressão da doença (Rutteman *et al.*, 2001). A paridade também não se associa com o risco de neoplasia de mama na gata (Misdorp *et al.*, 1991; Zappulli *et al.*, 2005), contrariamente ao referido na mulher (Ellis *et al.*, 2003).

Durante este estudo verificámos o uso generalizado de medicamentos hormonais para inibir o estro, produtos de uso específico de Medicina Veterinária (ex. Megecat[®]), ou pílulas humanas (ex. Provera[®]). As gatas tratadas com estes produtos apresentaram frequências mais elevadas dos 3 tipos de alterações mamárias analisadas. A associação da administração prolongada de contraceptivos à base de progesterona e derivados com o desenvolvimento de neoplasias mamárias foi relatada por vários autores (Theilen e Madewell, 1987; Misdorp *et al.*, 1991; Rutteman e Misdorp, 1993), que referem que as gatas tratadas apresentam um risco 3 vezes superior às gatas não tratadas de desenvolver neoplasias mamárias (Rutteman *et al.*, 2001); está também bem documentado o desenvolvimento de alteração fibroadenomatosa total (Holzworth, 1987; Martín de las Mulas *et al.*, 2000b; Ordás *et al.*, 2004; Loretto *et al.*, 2005). Todavia, os receptores de estrogénio, parâmetro com valor prognóstico no cancro de mama da mulher e da cadela, na gata apresentam uma expressão reduzida, ocorrendo a perda da dependência hormonal durante a progressão maligna (Martín de las Mulas *et al.*, 2000a; Rutteman *et al.*, 2001; Misdorp, 2002; Millanta *et al.*, 2005). A perda de expressão de receptores de estrogénio pode, em parte, explicar a alta agressividade biológica dos carcinomas da gata (Millanta *et al.*, 2005). Alguns autores defendem que estes tumores são um bom modelo para o estudo de carcinomas da mulher hormono-independente (Martín de las Mulas *et al.*, 2000a; Misdorp, 2002; Millanta *et al.*, 2005).

Em Medicina Veterinária, nas neoplasias da mama da gata, como na maioria dos outros tumores, a cirurgia é realizada com intenção curativa, sendo usualmente o único procedimento terapêutico efectuado. Na nossa série que incluía lesões provenientes de 24 clínicas e/ou hospitais veterinários de vários pontos do país, a maioria dos carcinomas rasava os bordos de

excisão (73%) ou não tinha sido totalmente extirpada (21%). Apesar dos gânglios regionais serem de fácil acesso cirúrgico (Zappulli *et al.*, 2005), a sua remoção foi rara. Estes 2 eventos contribuem certamente para o mau prognóstico classicamente conotado aos carcinomas da mama da gata.

Os tumores mamários caninos desde há vários anos que são estudados do ponto de vista da oncologia comparativa pela sua semelhança com os adenoma pleomórficos das glândulas salivares humanas, e pelo controverso papel das células mioepiteliais na histogénese de tumores complexos e mistos (Gärtner *et al.*, 1999; Rutteman *et al.*, 2001). As lesões da mama da gata são contudo um tema pouco explorado (Morrison, 1998), por evidenciarem uma menor heterogeneidade morfológica que as lesões mamárias da cadela, com uma menor frequência de envolvimento mioepitelial e/ou presença de elementos heterólogos (Moulthon, 1990; Jones *et al.*, 1997; Misdorp *et al.*, 1999). O contributo das células mioepiteliais na tumorigénese da mama da gata tem sido ignorado e negligenciado, à semelhança do que também tem vindo a ser reconhecido na mama da mulher (Lakhani e O'Hare, 2001).

É crítica corrente dos estudiosos que realizaram o sistema de classificação das lesões mamárias de cánídeos e felídeos adoptado pela OMS, que a classificação em carcinomas ductais e lobulares usada na mulher não deve ser adoptada em Medicina Veterinária pois não se fundamenta numa lógica de histogénese, que é sempre desejável (Misdorp, 1999; Misdorp, 2002). Porém, as tentativas de classificação histogenética são sempre controversas, sobretudo na mama, dada a dificuldade em separar com clareza as células ductais e as células lobulares e, também, pela dificuldade em compreender qual o papel das células mioepiteliais. Acresce haver evidência biológica para acreditar que ambas as células do epitélio mamário, luminais secretoras e basais/mioepiteliais, derivam de uma célula precursora (estaminal) com potencial de diferenciação divergente (Lakhani e O'Hare, 2001; Ellis *et al.*, 2003; Dontu *et al.*, 2004; Kalirai e Clarke, 2006). Por isso estes autores defendem que a classificação deve basear-se em critérios morfológicos fenotípicos de apresentação com os quais será possível desenvolver estudos de prognóstico, que ainda são insuficientes na gata (Misdorp, 1999; Rutteman *et al.*, 2001; Misdorp, 2002). Até ao momento não está provado que a classificação histológica nem o grau de diferenciação dos carcinomas da mama da gata tenham significado prognóstico (Theilen e Madewell, 1987; Misdorp *et al.*, 1999; Zappulli *et al.*, 2005).

Apesar da classificação da OMS dos carcinomas da mama da gata se basear nas características morfológicas (Misdorp, 1999; Rutteman *et al.*, 2001; Misdorp, 2002), não estabelece critérios para a sua avaliação; sugere que, na presença de vários padrões

arquiteturais, se use a combinação de padrões para relatar no diagnóstico, referindo o padrão predominante em primeiro lugar, como por exemplo carcinoma sólido-tubular (Misdorp, 1999; Misdorp, 2002). Esta abordagem, que privilegia o fenótipo, dá lugar a grande heterogeneidade de classificações e diagnósticos, que não têm, ou têm pouca associação, com o comportamento biológico. Quando classificámos as lesões mamárias segundo os padrões arquiteturais, verificámos que a maioria era heterogénea, com coexistência de 2 ou mais padrões arquiteturais. As formas puras, ou seja, com um padrão morfológico em mais de 90% da extensão tumoral, eram raras. Para a avaliação do padrão utilizamos o valor “cut off” de 50%: sempre que um padrão atingia 50% da extensão tumoral era classificado desse tipo. Verificámos contudo, que em muitos carcinomas nenhum dos padrões morfológicos atingia o valor cut-off, tendo sido designados de tumores de morfologia mista.

Observámos uma frequência elevada de lesões de padrão arquitetural sólido, ou padrões relacionados, como o padrão cribriforme e o micropapilar, caracterizado por pequenas aglomerações celulares papilares não associadas a estroma conjuntivo (Paterakos *et al.*, 1999; Ellis *et al.*, 2003; Sakamoto *et al.*, 2005). Embora o padrão micropapilar seja muito comum nos carcinomas da gata, não é reconhecido na classificação da OMS da gata e da cadela, sendo classificado de papilar ou túbulo-papilar. Por esta razão, e por não existirem critérios de avaliação dos vários padrões arquiteturais, vários estudos referem o carcinoma papilar ou túbulo-papilar como o tipo de carcinoma mais frequente (Rutteman *et al.*, 2001; Dias Pereira *et al.* 2004; Millanta *et al.*, 2005). Todavia, já em 1987 Holzworth referiu na gata a existência de tumores com áreas papilares avasculares (Holzworth, 1987). Em Medicina Humana nas primeiras descrições por Fisher *et al.* (1980), o padrão micropapilar foi incluído no espectro de alterações dos carcinomas papilares mas, desde as descrições de Siriaunkgul e Tavassoli em 1993 que é considerado uma entidade distinta de carcinoma (Kuroda *et al.*, 2004a; Sakamoto *et al.*, 2005). Este padrão morfológico é mais próximo do sólido que do papilar (Rosai, 1996).

Depois do exposto e, sendo os carcinomas da mama da gata tumores de elevada agressividade biológica, e depois dos estudos ao longo dos anos não terem observado qualquer associação entre o tipo histológico e o prognóstico, há uma questão que nos parece relevante:

Para que serve classificar os carcinomas em tipos histológicos?

Para tentar responder a esta questão e, em virtude de acharmos a classificação da OMS dos carcinomas mamários felinos omissa numas áreas e de complexidade desnecessária noutras, tentámos agrupar as lesões observadas conjugando os dois critérios: diferenciação histológica e fenótipo arquitetural, a exemplo do que é feito na patologia mamária da mulher,

dada a sua semelhança recíproca, por nós confirmada, a exemplo de outros investigadores como Misdorp e Weijer (1980), Ivanyi *et al.* (1993) e Pérez-Alenza *et al.* (2004)

As neoplasias da mama da gata evidenciaram vários aspectos similares aos observados em carcinomas da mama da mulher e das glândulas salivares:

- Muitos carcinomas apresentavam aspecto similar ao Carcinoma Adenóide Cístico, tumor caracterizado por apresentar células basofílicas pequenas dispostas segundo o padrão túbulo-trabecular, sólido e cribriforme, separadas por estroma mucinoso e condróide mesenquimatoso (Foshini e Eusebi, 1998; Kleer e Oberman, 1998; Reis-Filho *et al.*, 2004). Contudo, na gata não se confirmou a sua característica natureza bifásica (Foshini e Eusebi, 1998; Simpson, 2002).

- Observámos a existência de carcinomas bifásicos caracterizados por proliferação de 2 populações celulares, epiteliais luminais e mioepiteliais: os carcinomas epiteliais-mioepiteliais (CEMs). O CEM é um tipo raro de neoplasia descrito na mama (Wilson e Moran, 1997; Foschini e Eusebi, 1998; Foschini *et al.*, 2003; Tavassoli e Soares, 2003), glândulas salivares (Mantesso *et al.*, 2003; Colella *et al.*, 2004), pulmão (Wilson e Moran, 1997; Pelosi *et al.*, 2001) e pele do Homem (Seifert, 1998; Bult *et al.*, 2000). Apesar de terem localizações diferentes apresentam estrutura histológica e características imuno-histoquímicas similares (Seifert, 1998). Na bibliografia consultada apenas encontramos referência a 2 casos de CEM na parótida de felídeos domésticos (Sozmen *et al.*, 1998).

- Observámos também a existência de carcinomas com focos de metaplasia condróide (cartilagem mesenquimatosa e/ou bem diferenciada) à semelhança do observado nos tumores mistos da mama da cadela e tumores pleomórficos das glândulas salivares do Homem. Estes casos de CEMs e os carcinomas metaplásicos com elementos heterólogos reforça a inter-relação dos carcinomas de mama da gata e os tumores de mama e das glândulas salivares do Homem, como também ocorre entre os tumores complexos da mama das cadelas e os adenomas pleomórficos da glândula salivar (Rutteman *et al.*, 2001).

Depois de observarmos grupos tumorais com características morfológicas tão distintas agrupámos os carcinomas consoante a sua diferenciação celular e morfologia em

- Carcinoma epitelial-mioepitelial (CEM).
- Carcinoma metaplásico - onde se incluíram todos os carcinomas invasores com áreas metaplásicas superiores a 10% da massa neoplásica total.
- Carcinoma micropapilar invasor: este grupo foi criado após um estudo preliminar entre os vários padrões arquitecturais de carcinomas ductais invasores o ter salientado, à semelhança

do que tem vindo a ser descrito na mulher, como um grupo tumoral com alta agressividade biológica (Luna-More *et al.*, 1994; Walsh e Bleiweiss, 2001; Thor *et al.*, 2002; Kuroda *et al.*, 2004a, b; Nassar, 2004; Kim *et al.*, 2005).

- Carcinoma ductal invasor sem tipo específico (CDI-STE): incluiu todos os carcinomas que reproduziam estruturas ductais e que evidenciavam múltiplas formas de apresentação, mas não apresentavam características histológicas particulares que permitissem a sua classificação nos grupos específicos anteriormente descritos, daí o uso do sufixo sem tipo específico (STE) ou sem outra especificação (SOE).

Com base nestes critérios 65 carcinomas foram classificados como ductais (1 carcinoma papilar *in situ* - CDIS - e 64 CDI-STE), 8 como CEMs, 12 como metaplásicos e os restantes 8 como micropapilares invasores. Quando comparámos estes tipos histológicos com as variáveis clínico-patológicas, salientaram-se os CEMs por apresentarem critérios associados a bom prognóstico e os carcinomas metaplásicos e os micropapilares invasores por evidenciarem características conotadas com elevada agressividade biológica. Os CEMs surgiram preferencialmente em gatas Siamesas e antes dos 8 anos; eram lesões de pequenas dimensões (menor que 2 cm), crescimento lento, grau histológico e estadio baixos. Todos os outros tipos histológicos surgiram principalmente depois dos 11 anos, apresentavam dimensão superior a 2 cm, grau histológico e nuclear moderado a alto e estadio avançado. Salientaram-se os carcinomas metaplásicos com ulceração e invasão da camada muscular em mais de 50% da série e com a maior frequência de metástases ganglionares. Os carcinomas metaplásicos e os micropapilares foram também os que mais frequentemente evidenciaram grau III e permeação vascular.

O **CDI-STE** foi o tipo de carcinoma invasor mais comum na gata correspondendo a 69% dos carcinomas, à semelhança do referido na mulher (Rosai, 1996; Ellis *et al.*, 2003), onde representa a 40 a 75% dos carcinomas de mama (Ellis *et al.*, 2003; Milanezi, 2005; Ribeiro-Silva *et al.*, 2005). Esta designação corresponde a um grupo amplo e heterogéneo de lesões, com vários padrões morfológicos, que não exibem características histológicas particulares para serem classificados nos tipos específicos. Apesar da designação de ductal sabe-se que este, bem como todos os outros tipos de lesão da mama da mulher, gata e cadela, têm origem na unidade ducto-lobular terminal (Rosai, 1996; Petersen *et al.*, 2001; Rutteman *et al.*, 2001; Misdorp, 2002; Ellis *et al.*, 2003; Zappulli *et al.*, 2005). São as características cito-arquitecturais de diferenciação que estabelecem a identificação e não a sua origem na mama (Rosai, 1996).

Os CDI-STE da gata, à semelhança da mulher, apresentam aspectos macro e microscópicos variáveis (Rosai, 1996; Ellis *et al.*, 2003). Eram lesões frequentemente múltiplas, de tamanho variável (64% tinham tamanho igual ou superior a 2 cm), que afectavam gatas de idade avançada e apresentavam grau histológico II ou III, grau nuclear alto, estadio 2 ou 3, necrose e diferenciação epidermóide frequentes (71%). A frequência de diferenciação epidermóide foi muito superior à referida na mulher (0,5-3,7%) (Brenner *et al.*, 1998), o mesmo se verificando na frequência do padrão micropapilar, presente em 82% dos CDI-STE da gata e referenciado em apenas 3-6% dos CDI-STE da mulher (Ellis *et al.*, 2003). A permeação vascular linfática foi observada em 70% dos casos e 22% dos casos apresentavam metástases nos gânglios regionais na altura da exereze.

Os **CEMs** felinos representaram 8,5% da totalidade dos carcinomas analisados; frequência mais elevada que a referida para a mama da mulher (menos de 1%) (Korsching *et al.*, 2005). Eram massas sólidas e firmes, bem delimitadas mas não capsuladas, caracterizadas por proliferação bifásica de células epiteliais e mioepiteliais rodeadas por estroma escasso, fibroso. As células luminais formavam ninhos ou cordões sólidos e eram rodeadas por uma camada contínua de células mioepiteliais, que ocasionalmente formavam agregados sólidos. Eram lesões de baixo grau histológico, estadio e índice mitótico baixos, com necrose pouco frequente. Estas características estão de acordo com as descrições dos CEMs do Homem (Wilson e Moran., 1997; Rasbridge e Millis, 1998; Ahmed e Heller, 2000; Kihara *et al.*, 2001; Pelosi *et al.*, 2001; Mantesso *et al.*, 2003; Papaevangelou *et al.*, 2004; Reis-Filho *et al.*, 2004).

Apresentavam limites expansivos mas, com uma observação mais acurada, facilmente se detectavam pequenos focos de invasão, o que foi também referido por Simpson (2002) e Colella *et al* (2004). A maioria não evidenciava diferenciação epidermóide, evento comum nos outros tipos histológicos analisados. Todas as lesões eram solitárias, com excepção de uma intraductal papilar invertida que era multicêntrica, devido à disseminação intraductal da lesão.

Dos carcinomas analisados só um evidenciou permeação vascular. Era um tumor ulcerado de 2,5 cm, de alto grau histológico e nuclear, removido de uma gata de 14 anos. O componente epitelial desta lesão adquiriu padrão arquitectural micropapilar, invadiu de forma extensiva os tecidos adjacentes e desenvolveu metástases ganglionares micropapilares. Este foi o único CEM associado ao padrão micropapilar e foi a única gata com CEM que morreu de doença oncológica durante o estudo. Simpson (2002) referiu que ocasionalmente um dos componentes do CEM pode sofrer indiferenciação e crescer predominando na lesão, sob a forma de carcinoma de alto grau ou de carcinoma fusiforme. A presença de áreas anaplásicas, margens

infiltrativas (Foschini e Eusebi, 1998; Bult *et al.*, 2000; Tavassoli e Soares, 2003), actividade mitótica e necrose (Bult *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2003) podem ser sugestivos de um fenótipo mais agressivo, existindo o risco de metástases (Rasbridge e Millis, 1998; Ahmed e Heller, 2000; Tavassoli e Soares, 2003), que podem ser de natureza mioepitelial, carcinomatosa ou bifásica (Rasbridge e Millis, 1998).

O **carcinoma micropapilar invasor** é um tipo histológico distinto de carcinoma ductal invasor da mama, que tem sido associado a linfotropismo e uma incidência muito alta de metástases ganglionares (Luna-More *et al.*, 1994; Paterakos *et al.*, 1999; Gunhan-Bilgen *et al.*, 2002; Thor *et al.*, 2002; Nassar, 2004; Kim *et al.*, 2005; Putti *et al.*, 2005).

Esta variante tem características histológicas distintas: pequenos aglomerados celulares formando estruturas papilares avasculares (sem eixo conjuntivo) ou grupos morulados de células epiteliais invasoras, rodeadas por lacunas vazias resultantes de retracção artefactual do estroma, que mimetizam invasão vascular (Luna-More, 1994; Paterakos *et al.*, 1999; Walsh e Bleiweiss, 2001; Gunhan-Bilgen *et al.*, 2002; Ellis *et al.*, 2003; Putti *et al.*, 2005). As células, cubóides ou poliédricas, de citoplasma acidófilo ou anofílico e núcleo eucromático, apresentavam frequentemente polaridade celular invertida. A polaridade invertida é uma característica deste tipo histológico (Kuroda *et al.*, 2005b), na mama da mulher, foi confirmada por estudos de ultra-estrutura (Paterakos *et al.*, 1999; Ramalingam *et al.*, 2003; Sakamoto *et al.*, 2005).

Na gata as formas puras eram raras e o padrão micropapilar surgiu frequentemente associado a outras formas mais comuns de carcinoma invasor, à semelhança do referido na mulher (Luna-More *et al.*, 1994; Kuroda *et al.*, 2004a; Ramalingam *et al.*, 2003; Sakamoto *et al.*, 2005). Surgiu frequentemente associado ao padrão sólido e a pequenas áreas papilares. Neste estudo, à semelhança do referido por Tsumagari *et al.* (2001), só classificámos como micropapilares os carcinomas com componente micropapilar invasor igual ou superior a 50% da massa neoplásica total. Porém, áreas micropapilares menos extensas foram observadas em 82% dos CDI-STE e em 54% dos carcinomas metaplásicos.

Com base neste critério os carcinomas micropapilares constituíram 8,5% da totalidade dos carcinomas da gata. A frequência deste tipo histológico na mama da mulher varia muito: Zekioglu *et al.* (2004) referiu 2,6%, Luna-More *et al.* (1994) 2,7%, Tsumagari *et al.* (2001) 3,4%, Nassar (2004) 6% e Kim *et al.* (2005) 17,5%. Estas diferenças são justificadas por algumas séries incluem todos os carcinomas com áreas micropapilares, outras só incluem

carcinomas com predomínio do componente micropapilar (mais de 50% no estudo de Tsumagari *et al* (2001) e mais de 75% no de Zekioglu *et al.* (2004)).

Os carcinomas micropapilares da gata eram tumores de grandes dimensões, grau histológico e nuclear altos e estadio avançado, à semelhança do referido na mulher (Kuroda *et al.*, 2004a; Ramalingam *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005). Todos apresentavam pequenos focos de diferenciação epidermóide. Apesar da permeação vascular neste estudo (87,5%) ser superior ao referido por Ellis *et al.* (2003) na mulher (60%), a fracção de carcinomas metastásicos (25%) é inferior ao mencionado pelos mesmos investigadores (72 a 77%). À semelhança do referido na mulher os êmbolos e as metástases mantêm o padrão do tumor primário (Ellis *et al.*, 2003). Na mama adjacente ao carcinoma invasor, a maioria das gatas evidenciava CDIS (5/7) de padrão micropapilar e sólido (em 4 casos) ou cribriforme (1 caso).

Recentemente em Medicina Humana foram descritos carcinomas de padrão micropapilar em vários órgãos nomeadamente no pulmão (Kuroda *et al.*, 2005a; Kuroda *et al.*, 2006) e bexiga (Amin *et al.*, 2002; Ramalingam *et al.*, 2003; Nassar, 2004; Sakamoto *et al.*, 2005; Kuroda *et al.*, 2006), ovário (Amin *et al.*, 2002; Ramalingam *et al.*, 2003), pélvis renal, ureter (Dhouib *et al.*, 2005; Holmang *et al.*, 2006; Perez-Montiel *et al.*, 2006) e glândula salivar (Ramalingam *et al.*, 2003; Nassar, 2004; Sakamoto *et al.*, 2005). Todos têm estrutura histológica similar e associam-se a extensa metastização ganglionar (Ramalingam *et al.*, 2003; Sakamoto *et al.*, 2005). Este padrão não parece ser específico de nenhum local primário e, sempre que presente deve pesquisar-se a existência de metástases (Amin *et al.*, 2002; Ramalingam *et al.*, 2003). Vários estudos sugerem que independentemente da sua extensão, as áreas micropapilares podem determinar o comportamento biológico do tumor (Walsh e Bleiweiss, 2001; Kim *et al.*, 2005).

Os **carcinomas metaplásicos** ocorrem em vários locais anatómicos e, apesar de serem utilizadas diferentes terminologias, são aparentemente tumores similares (Kurian e Al-Nafussi, 2002). Na mama representam um grupo raro e heterogéneo de carcinomas invasores (Ellis *et al.*, 2003; Barnes *et al.*, 2005; Reis-Filho *et al.*, 2005; Dave *et al.*, 2006; Tse *et al.*, 2006) em que o epitélio glandular sofreu metaplasia, de tipo não glandular ou em células mesenquimatosas (Catroppo e Lara, 2001; Adem *et al.*, 2002; Kurian e Al-Nafussi, 2002; Barnes *et al.*, 2005; Dave *et al.*, 2006). Assim, esta designação refere-se a carcinomas associados a áreas de proliferação de células fusiformes, epidemóides e/ou diferenciação mesenquimatosa com presença de elementos heterólogos, como osso e cartilagem (Chao *et al.*, 1999; Catroppo e Lara, 2001; Ellis *et al.*, 2003; Davis *et al.*, 2005). O carcinoma metaplásico é

uma neoplasia com diferenciação divergente, não só varia de um tumor para outro como de uma área para outra na mesma lesão (Catroppo e Lara, 2001). Alguns destes carcinomas comportam-se como sarcomas, sem envolvimento ganglionar regional e disseminação por via sanguínea (Catroppo e Lara, 2001; Barnes *et al.*, 2005; Davis *et al.*, 2005; Leibl *et al.*, 2005).

Neste estudo os carcinomas metaplásicos corresponderam a 12,7% da totalidade dos carcinomas analisados, valor superior ao referido na mama da mulher (1%) (Ellis *et al.*, 2003; Barnes *et al.*, 2005; Reis-Filho *et al.*, 2005; Dave *et al.*, 2006). Observámos 4 carcinomas com áreas epidermóides, 2 carcinomas de células fusiformes e 6 com diferenciação condróide. Os carcinomas de células fusiformes observados e um dos carcinomas com componente epidermóide eram formas puras, não associadas a carcinoma ductal invasor, situação bem conhecida na mama da mulher (Behranwala *et al.*, 2003; Ellis *et al.*, 2003).

A maioria destes carcinomas surgiu em gatas de idade avançada e atingiu grandes dimensões (50% tinham mais de 3 cm de diâmetro); evidenciavam grau histológico, nuclear e índices proliferativos altos, ulceração, invasão da camada muscular e estadio alto, à semelhança do referido na mulher (Chao *et al.*, 1999; Kurian e Al-Nafussi, 2002; Behranwala *et al.*, 2003; Ellis *et al.*, 2003; Tse *et al.*, 2006). Apesar da metastização ganglionar ser pouco frequente na mulher (Chao *et al.*, 1999; Bellino *et al.*, 2003; Ellis *et al.*, 2003; Barnes *et al.*, 2005), na gata este foi o tipo histológico com maior frequência de metastização (41%). As metástases foram mais frequentes nos carcinomas com elementos heterólogos; duas das 4 metástases com origem nestes carcinomas evidenciavam elementos metaplásicos, o que está de acordo com os estudos que referem que este tipo histológico geralmente manifesta o seu potencial metaplásico nas metástases (Ellis *et al.*, 2003). No grupo dos carcinomas com áreas epidermóides, apenas o carcinoma epidermóide puro desenvolveu metástases. Na mulher, aproximadamente 10% dos carcinomas epidermóides puros e 19-25% dos com elementos heterólogos apresentam metástases ganglionares axilares no momento da apresentação e, alguns estudos, referem uma maior frequência de envolvimento ganglionar (56%) nos carcinomas de células fusiformes (Ellis *et al.*, 2003). Todavia no nosso estudo nenhum carcinoma de células fusiformes evidenciou metástases.

Alguns estudos na mama da mulher referem um prognóstico desfavorável em todo o grupo de carcinomas metaplásicos, sendo a classificação em subtipos mais do interesse do patologista que do clínico (Chao *et al.*, 1999; Dunne *et al.*, 2003; Leibl *et al.*, 2005), outros demonstram a existência de prognóstico variável dependendo do padrão histológico (Catroppo e Lara, 2001; Dunne *et al.*, 2003, Davis *et al.*, 2005).

Quando efectuámos o estudo de sobrevivência, obtivemos um valor mediano de sobrevivência total de 8 meses, que está em concordância com o referido em estudos prévios (Rutteman *et al.*, 2001; Castagnaro *et al.*, 1998a,b; Skorupski *et al.*, 2005). Quando comparámos os tempos de sobrevivência livre de doença e total com o tipo histológico verificámos diferenças significativas: salientaram-se os CEMs com os melhores tempos de sobrevivência e os carcinomas micropapilares e os metaplásicos com os piores tempos. Durante o período de estudo apenas morreram 2 gatas com CEM, uma por complicações anestésicas após a cirurgia e outra por doença oncológica e, no final do período de seguimento, 67% das gatas estavam vivas. Assim, comprovámos que os CEMs estavam associados a critérios clínico-patológicos de menor agressividade biológica e a melhor prognóstico, o que está certamente relacionado com a presença de células mioepiteliais, que pelos seus efeitos supressores do crescimento e invasão são consideradas células supressoras dos tumores (Sternlicht *et al.* 1997; Foschini *et al.* 2003). Também Castagnaro *et al.* (1998a) observaram um grupo de carcinomas de mama de gatas com população mioepitelial abundante, que estava associado a melhor prognóstico.

Os carcinomas micropapilares e metaplásicos, por oposição, associaram-se a critérios histológicos de alta agressividade biológica, o que se traduziu em baixos tempos de sobrevivência, livre de doença e total, o que está de acordo com o mau prognóstico descrito na literatura (Chao *et al.*, 1999; Walsh e Bleiweiss, 2001; Dunne *et al.*, 2003; Kuroda *et al.*, 2004a; Kim *et al.*, 2005). O CDI-STE, sendo um grupo muito heterogéneo do ponto de vista histológico, evidenciou comportamento intermédio entre os CEM e os outros tipos analisados.

Resultados similares foram observados no grupo de gatas com gânglios linfáticos negativos (N₀) na análise univariada. Neste grupo, o tipo histológico foi mesmo factor de prognóstico independente, evidenciando os carcinomas metaplásicos e micropapilares um aumento substancial do risco de morrerem por doença oncológica; este aumento do risco foi de 4,4 vezes para os carcinomas metaplásicos e de 6,1 vezes para os carcinomas micropapilares.

Depois do exposto, podemos finalmente responder à questão “Vale a pena classificar os carcinomas?”: é claro que a classificação em tipos histológicos é importante, permitindo distinguir grupos tumorais com comportamento biológico distinto. É pois essencial a revisão da classificação da mama da gata e a introdução dos tipos histológicos aqui propostos.

À semelhança do referido na mulher, o CDI-STE sendo o protótipo do cancro de mama (Rosai, 1996) e constituindo uma grande proporção dos carcinomas mamários, é um grupo que reflecte, do ponto de vista epidemiológico, as características dos carcinomas como um todo (Ellis *et al.*, 2003); parte da agressividade biológica deste grupo, bem como dos carcinomas de

mama da gata no geral, pode ser reflexo da presença frequente do padrão arquitectural micropapilar. A sua presença, mesmo numa pequena fracção do tumor, pode determinar a sua evolução (Ramalingam *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005), pelo que alguns autores recomendam mencionar a ocorrência deste padrão e a sua percentagem relativa no relatório de Anatomia Patológica de qualquer tipo tumoral (Ramalingam *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005).

É também premente a graduação das lesões mamárias por rotina, pois verificámos que os diferentes graus estavam associados a diferenças nos tempos de sobrevivência, livre de doença e total, na análise univariada da totalidade da série e no grupo das gatas N₀, apresentando os carcinomas de grau III os piores tempos de sobrevivência. A análise multivariada evidenciou também o grau histológico como factor de prognóstico independente relativamente à sobrevivência livre de doença e total na totalidade da série de carcinomas e, para a sobrevivência total no grupo de gatas N₀. Estes resultados estão de acordo com o estudo de Misdorp e Weijer (1980) que referiram que o grau estava associado com a sobrevivência pós-cirúrgica na mama da gata. Assim, achamos que todos os carcinomas mamários devem ser graduados e, a conjugação da informação do tipo histológico com o grau permite prever de forma mais acurada o comportamento biológico das lesões (Ellis *et al.*, 2003). Pelo exposto, recomendamos a graduação dos carcinomas de mama, o que ainda não é prática corrente em Medicina Veterinária.

Outros critérios de grande importância para avaliar a oncobiologia dos carcinomas de mama da gata são a pesquisa de permeação vascular e de metástases ganglionares regionais, parâmetros que se revelaram prognóstico na análise univariada para a sobrevivência livre de doença e total, o que foi também referido por Misdorp e Weijer (1980) e Rutteman *et al.* (2001). Na análise multivariada foram factores de prognóstico independentes a permeação linfática nas gatas N₀ e a metastização ganglionar na totalidade da série. O seu valor prognóstico no cancro de mama da mulher, bem como do tipo e grau histológico e dos índices de proliferação, entre outros, está bem documentado na literatura (Weidner *et al.*, 1992; van de Vijver *et al.*, 2002; Kuru *et al.*, 2003; Milanezi, 2005). A dimensão das lesões foi também factor de prognóstico para a sobrevivência livre de doença, o que também foi referido por MacEwen *et al.* e Weijer e Hart (citados por Skorupski *et al.*, 2005) e Morrison (1998) na mama da gata mas para a sobrevivência total; Rutteman *et al.*, (2001) refere que o tamanho é o único factor com importância comprovada no prognóstico das gatas. Assim, tem de haver um esforço de “sensibilização” não só dos proprietários para a excisão precoce das lesões mamárias, mas também dos cirurgiões para, que ao remover as lesões, o façam com margem de

segurança livre de doença oncológica, e “tentem” pesquisar e remover os gânglios linfáticos regionais.

Este trabalho revela que um estudo de Anatomia Patológica de rotina, mesmo sem o recurso a outros marcadores moleculares, permite separar claramente gatas com baixo e alto risco de progressão da doença oncológica.

Neste estudo recorreremos à marcação por imuno-histoquímica com **vimentina e marcadores de diferenciação basal/mioepitelial**, para confirmar as características bifásicas do CEM e distinguir os carcinomas invasores dos CDIS, o que nem sempre é fácil utilizando a coloração de H&E, como revelam os estudos de Damiani *et al.* (1999), Zhang *et al.* (2003) e Hill e Yeh (2005). A aparência das células mioepiteliais varia dependendo do estado fisiológico ou patológico (Ahmed e Heller, 2000; Pelosi *et al.*, 2001; Simpson, 2002; Agnantis, 2005) e, frequentemente na mama da gata, carcinomas invasores mimetizavam lesões *in situ*.

Vários estudos referem a existência de 2 camadas de células parenquimatosas na glândula mamária, uma luminal/glandular e a outra, justaposta à membrana basal, designada de basal/mioepitelial (Singh Gill *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2000; Simpson, 2002; Agnantis, 2005). A camada luminal expressa citoqueratinas (CKs) de baixo peso molecular (CK8, CK18; CK19) e, as células mioepiteliais, de aspecto cubóide ou fusiforme, expressam queratinas de alto peso molecular (CK5, CK14, CK17) e proteínas contrácteis, mas são negativas às queratinas luminais (Rakha *et al.*, 2006). Recentemente foi identificada terceira população celular no compartimento luminal da mama não neoplásica que expressa queratinas basais sem expressão de queratinas luminais ou marcadores mioepiteliais, que se pensa representar células progenitoras adultas ou estaminais (Douglas-Jones *et al.*, 2005; Gusterson *et al.*, 2005; Rakha *et al.*, 2006). A maioria dos carcinomas tem origem no componente luminal e expressa citoqueratinas luminais (Petersen *et al.*, 2001; Gusterson *et al.*, 2005).

As células mioepiteliais formam uma camada contínua nos carcinomas *in situ* e estão ausentes na maioria dos carcinomas invasores (Damiani *et al.*, 1999; Adriance *et al.*, 2005). Podem ser evidenciadas por métodos de imuno-histoquímica, marcando pela α -actina do músculo liso, calponina, miosina do músculo liso de cadeia pesada, S100, algumas citoqueratinas (ex. CK14) (Jones *et al.*, 2000; Pelosi *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2003; Tavassoli e Soares, 2003; Agnantis, 2005), maspina, p63 (Lakhani e O'Hare, 2001; Reis-Filho *et al.*, 2001; Simpson, 2002) e vimentina (Foschini e Eusebi, 1998).

A calponina é uma proteína de 34 kD com função reguladora da contração do músculo liso, mais específica do mioepitélio que a actina do músculo liso (Damiani *et al.*, 1999; Espinosa de los Monteros *et al.*, 2002; Douglas-Jones *et al.*, 2005). O anticorpo anti-calponina também reconhece componentes mesenquimatosos como os miofibroblastos (Damiani *et al.*, 1999; Werling *et al.*, 2003; Edwards *et al.*, 2004; Hill e Yeh, 2005).

O p63 é um factor de transcrição nuclear homólogo do gene p53 (Gama *et al.*, 2003, Werling *et al.*, 2003; Edwards *et al.*, 2004; Ribeiro-Silva *et al.*, 2005; Tse *et al.*, 2006), necessário à regulação da diferenciação e proliferação das células epiteliais progenitoras/estaminais (Reis-Filho *et al.*, 2003b; Ribeiro-Silva *et al.*, 2005). A proteína p63 é expressa nas células basais de vários epitélios estratificados (Gama *et al.*, 2003; Ribeiro-Silva *et al.*, 2003; Tse *et al.*, 2006) sendo provavelmente necessária à sua diferenciação (Edwards *et al.*, 2004; Matos *et al.*, 2005). Na mama não neoplásica é expressa nas células mioepiteliais (Gama *et al.*, 2003; Ribeiro-Silva *et al.*, 2003; Tse *et al.*, 2006), basais e nas células estaminais, mas só raramente é expressa nos carcinomas invasores e metástases (Reis-Filho *et al.*, 2003).

A CK14 é expressa na camada basal dos epitélios estratificados e nas células mioepiteliais (Gama *et al.*, 2003; Reis-Filho *et al.*, 2003b; Gusterson *et al.*, 2005). Não encontramos, na bibliografia consultada, nenhum estudo da expressão de CK14, p63 ou calponina em lesões de mama da gata.

A **vimentina** é a proteína mais abundante dos filamentos intermédios das células conjuntivas. No tecido mamário não neoplásico e neoplasias benignas a expressão de vimentina foi observada nas células estromais e mioepiteliais, o que está de acordo com estudos prévios (Hellmen e Lindgren, 1989; Gärtner *et al.*, 1999; Gama *et al.*, 2003). Contrariamente ao estudo de Korsching *et al.* (2005) que observou expressão de vimentina numa minoria de carcinomas ductais invasores da mulher, no nosso estudo, a maioria dos carcinomas expressou este marcador. A expressão difusa foi mais frequente em carcinomas de alto grau histológico e nuclear e ocorreu principalmente em carcinomas metaplásicos, tipo histológico que apresentou os piores tempos de sobrevivência; estas associações entre a expressão de vimentina e o grau histológico (Gilles *et al.*, 1996; Willipinski-stapelfeldt *et al.*, 2005) e a sobrevivência (Gilles *et al.*, 1996) estão bem documentadas na mama da mulher. A expressão de vimentina foi interpretada por vários autores como um sinal de transição epitélio-mesénquima (Gilles *et al.*, 1996; Petersen *et al.*, 2001; Korsching *et al.*, 2005; Bindels *et al.*, 2006; Livasy *et al.*, 2006), uma fase terminal de indiferenciação tumoral, geralmente associada a alto potencial invasor (Gilles *et al.*, 1996; Korsching *et al.*, 2005; Bindels *et al.*, 2006). Estudos de hibridação

genómica comparada comprovaram que os carcinomas de alto grau apresentam um número significativo de alterações genómicas, o que pode alterar a expressão de vários genes; alterações epigenéticas podem também promover a expressão de proteínas que estão silenciadas nas células normais, nomeadamente de vimentina (Reis-Filho, 2005). Estudos recentes sugerem que a expressão de vimentina pode ser uma evidência de que as neoplasias tenham origem em células estaminais (Korsching *et al.*, 2005; Livasy *et al.*, 2006).

No nosso estudo as lesões de CDIS também evidenciaram expressão focal de vimentina, o que também foi referido por outros autores (Korsching *et al.*, 2005; Reis-Filho, 2005).

Todos os **marcadores basais/mioepiteliais** estudados apresentaram expressão constante nas células basais/mioepiteliais da mama não neoplásica e neoplasias benignas, o que está de acordo com vários trabalhos (Damiani *et al.*, 1999; Martín de las Mulas *et al.*, 2002; Espinosa de los Monteros *et al.*, 2002; Gama *et al.*, 2003; Ribeiro-Silva *et al.*, 2003; Matos *et al.*, 2005, Livasy *et al.*, 2006; Rakha *et al.*, 2006). O recurso a estes marcadores permitiu verificar que, contrariamente ao referido na literatura, as células basais/mioepiteliais não são raras nos tumores de mama da gata.

No nosso, como em outros estudos, as células mioepiteliais dos CEMs revelaram forte imunorreactividade aos vários marcadores estudados, confirmando a sua natureza bifásica (Simpson, 2002; Foschini *et al.*, 2003; Kesse-Adu e Shousha, 2004; Hungermann *et al.*, 2005). É possível que estes tumores com diferenciação mioepitelial resultem da transformação neoplásica de células estaminais capazes de diferenciação divergente (Foschini e Eusebi, 1998; Lakhani e O'Hare, 2001; Rakha *et al.*, 2006).

Detectou-se ainda positividade basal/mioepitelial ocasional em carcinomas micropapilares e, com alguma frequência em CDI-STE, que evidenciaram células basais/mioepiteliais remanescentes ou hiperplásicas; em 4 CDI-STE observou-se população basal/mioepitelial abundante, positiva à calponina, CK14 e p63 que, nas áreas de invasão apresentavam características basais, perdendo a expressão de calponina. Estas observações estão de acordo com as características supressoras da invasão classicamente atribuídas às células mioepiteliais (Sternlicht *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 2003; Adriance *et al.*, 2005). O “desligar” do fenótipo mioepitelial para evidenciar características basais também está de acordo com o que tem vindo a ser extensamente descrito na literatura de Medicina Humana nos últimos anos, que referem a maior agressividade biológica dos tumores de células basais (Jones *et al.*, 2004; Nielson *et al.*, 2004; Gusterson *et al.*, 2005; Rakha *et al.*, 2006). O contributo das células mioepiteliais nos CDI-STE é pouco clara mas, diferenciação mioepitelial focal ou

difusa, avaliada por imuno-histoquímica, é detectada em 1 a 18% dos casos de CDI-STE da mulher (Lakhani e O'Hare, 2001; Jones *et al.*, 2004).

Nos carcinomas metaplásicos além da positividade difusa à vimentina, observou-se positividade à calponina e p63 em ambos os carcinomas de células fusiformes ainda que fosse inconstante e ténue; um dos carcinomas evidenciou ainda positividade à CK14. Estes resultados estão em concordância com estudos na mama da mulher (Foschini *et al.*, 2003; Hungermann *et al.*, 2005; Tse *et al.*, 2006). O p63 pode ser útil para a identificação dos carcinomas de células fusiformes já que os sarcomas são negativos a este marcador (Tse *et al.*, 2006). Observou-se ainda positividade constante à CK14 e p63 na camada basal das áreas epidermóides, mas não nas áreas glandulares; estudos recentes têm referido que o p63 é um bom indicador de células basais dos carcinomas epidermóides indiferenciados ou CDI com áreas epidermóides (Reis-Filho *et al.*, 2003a; Edwards *et al.*, 2004; Matos *et al.*, 2005; Tse *et al.*, 2006).

Os carcinomas metaplásicos com elementos heterólogos apresentaram positividade rara a todos os marcadores. Contudo, neste último grupo lesional era frequente a presença de grânulos positivos à calponina no citoplasma das células carcinomatosas, o que pode ser reminiscência de filamentos intermédios que são perdidos durante a cancerização, ou podem ser um sinal de diferenciação mioepitelial incompleta (abortiva). Todos os subtipos de carcinomas metaplásicos, em particular os de células fusiformes, evidenciaram imunomarcacão sugestiva de histogénese mioepitelial, à semelhança do que tem vindo a ser descrito na mama da mulher (Dunne *et al.*, 2003; Reis-Filho *et al.*, 2003a; Reis-Filho *et al.*, 2003b). Oberman *et al.* citado por Reis-Filho *et al.* (2003a), descreveram o carcinoma metaplásico como um grupo de carcinomas bifásicos da mama, que exibem frequentemente diferenciação epidermóide, e componentes mesenquimatosos incluindo células fusiformes, osso, cartilagem, estroma mixóide e/ou células gigantes. Há contudo uma grande controvérsia relativamente à histogénese destes tumores: de acordo com alguns autores derivam de células mioepiteliais, outros defendem uma origem no epitélio secretor. Várias linhas de investigação favorecem a génese mioepitelial: em células mioepiteliais reactivas e tumores de células mioepiteliais são observadas frequentemente alterações metaplásicas, epidermóides e/ou mesenquimatosas, eventos raramente associados às células luminais (Reis-Filho *et al.*, 2003a). Há evidências que sugerem que a diferenciação mioepitelial pode ser incompleta (Petersen *et al.*, 2001; Reis-Filho, 2005). Se uma neoplasia expressa actina de músculo liso, CD10 e vimentina mas não apresenta positividade ao p63 ou outro marcador basal/mioepitelial não se pode refutar a possibilidade de ser de origem mioepitelial (Reis-Filho, 2005).

Se na mulher a célula mioepitelial é a “cinderela” do tecido mamário, que tem sido ignorada no contexto do cancro de mama (Lakhani e O’Hare, 2001), ainda o é mais na gata onde há a “tradição” de que esta célula não é importante na tumorigénese da mama da gata, contrariamente ao observado na cadela. São obviamente necessários outros estudos para confirmar a histogénese basal/mioepitelial dos carcinomas metaplásicos dos felinos.

A maioria dos carcinomas expressou CK14 nas células luminais, observando-se expressão difusa principalmente nos carcinomas metaplásicos; o CEM foi o tipo histológico que evidenciou com menor frequência positividade nas células luminais. A imunorreactividade à CK14 foi observada de forma quase constante nos ninhos de invasão. A marcação por esta CK basal pode sugerir que os carcinomas da mama da gata apresentam células de fenótipo basal/mioepitelial, o que pode também ser responsável pela sua alta agressividade biológica.

Vários estudos com marcadores basais têm evidenciado a existência de um grupo de carcinomas humanos com características basais, com origem provável em células estaminais da mama (Gusterson *et al.*, 2005; Reis-Filho *et al.*, 2003b; Ribeiro-Silva *et al.*, 2005; Rakha *et al.*, 2006). Estes tumores são um grupo biológica e morfológicamente diverso, mas evidenciam alto grau histológico, são negativos ao HER-2 e a receptores hormonais, e associam-se a recidiva precoce e a mau prognóstico (Reis-Filho *et al.*, 2003a; Jones *et al.*, 2004; Nielsen *et al.*, 2004; Rakha *et al.*, 2006). Cerca de 18% a 29% dos carcinomas de mama da mulher evidenciam fenótipo basal/mioepitelial (Reis-Filho *et al.*, 2003b; Jones *et al.*, 2004; Kesse-Adu e Shousha, 2004; Nielsen *et al.*, 2004; Gusterson *et al.*, 2005; Livasy *et al.*, 2006; Rakha *et al.*, 2006), que pode ser parcial ou incompleto, co-existindo com a expressão de citoqueratinas luminais (Gusterson *et al.*, 2005; Ribeiro-Silva *et al.*, 2005). Com o advento da técnica de “microarrays” o fenótipo basal tornou-se mais notório (Reis-Filho *et al.*, 2003a; Gusterson *et al.*, 2005), principalmente quando se tornou óbvio que os fenótipos de expressão genética (assinatura genética) evidenciados por esta técnica eram sobreponíveis com resultados obtidos por imuno-histoquímica. Assim, um painel de anticorpos pode, de forma bastante sólida, identificar o fenótipo basal e/ou basalóide (“basal-like”) dos carcinomas da mama da mulher (Nielsen *et al.*, 2004; Livasy *et al.*, 2006).

A **taxa de proliferação** é um factor de prognóstico nos tumores da mama da mulher e da gata (Zappulli *et al.*, 2005). Este parâmetro pode ser avaliado pela contagem do número de mitoses, por citometria de fluxo (fase S), contagem de AgNORs, e pelos índices de PCNA e de Ki-67 (Castagnaro *et al.* 1998b; Dias Pereira *et al.*, 2004; Zappulli *et al.*, 2005).

A proteína Ki-67 é uma proteína não-histona com cerca de 345 a 395 kD (Gerdes *et al.*, 1983), muito conservada na escala filogenética (Preziosi *et al.*, 2002; Dias Pereira *et al.*, 2004), que se pensa ser essencial à divisão celular (Brown e Gatter, 2002). É expressa durante as fases G₁, S, G₂ e M do ciclo celular, mas não nas células em G₀ (Gerdes *et al.*, 1983; Castagnaro *et al.* 1998b, Geraldles *et al.*, 2000; Zuccari *et al.*, 2004). Tem uma localização muito específica no núcleo e a sua presença na célula é rigorosamente controlada, com uma semi-vida de cerca 60 a 90 minutos (Brown e Gatter, 2002).

Neste estudo obtivemos imunoreactividade ao antígeno Ki-67 na totalidade da série, com positividade nuclear moderada a forte e marcação nucleolar à semelhança do referido por Leonardi *et al.* (1992) e Castagnaro *et al.* (1998b). As mitoses evidenciaram sempre uma forte marcação. Os índices proliferativos foram mais baixos nas alterações fibroquísticas e tumores benignos e altos nas alterações fibroadenomatosas e nos carcinomas. A alteração fibroadenomatosa, alteração fibroepitelial hiperplásica, evidenciou índices de proliferação muito superiores aos observados nos fibroadenomas, quer no componente epitelial quer estromal, e próximos dos observados nos carcinomas. Estes índices proliferativos reflectem-se no desenvolvimento rápido desta alteração mamária, em alguns dias a semanas, atingindo grandes dimensões (Holzworth, 1987; Martín de las Mulas *et al.* 2000b; MacDougall, 2003; Loretto *et al.*, 2005) e estão de acordo com estudos prévios na mama da gata (Millanta *et al.* 2002; Dias Pereira *et al.* 2004). Quando comparámos as lesões adjacentes aos carcinomas verificámos um aumento da proliferação das alterações fibroquísticas para os CDIS, lesão que evidenciou índices proliferativos similares ou mesmo superiores aos carcinomas invasores, sugerindo que estão em evolução no processo de cancerização. Índices proliferativos muito altos devem ser considerados factores de risco pela possibilidade de originarem novas mutações ou clones com maior agressividade biológica (Preziosi *et al.*, 2002); na mulher estima-se que 25% dos CDIS de alto grau progridem para carcinoma invasor (Jones *et al.*, 2003; Fernández-Aguilar *et al.*, 2005).

Quando comparámos a proliferação das alterações fibroquísticas presentes na periferia dos carcinomas e as solitárias, não se observaram diferenças marcadas mas, a mama adjacente aos carcinomas evidenciou maior índice mitótico, provavelmente por estar exposta a factores de crescimento de origem tumoral.

Apesar de existirem poucos estudos da expressão de antígeno Ki-67 na mama da gata, os resultados são controversos: Millanta *et al.* (2002a) não encontraram qualquer significado prognóstico do Ki-67 mas Castagnaro *et al.* (1998b) associam-no com a sobrevivência pós-cirúrgica. Neste estudo, o índice mitótico relacionou-se de forma muito significativa com o

índice de Ki-67. Obtivemos um valor mediano de Ki-67 nos carcinomas de 38,5% (variando entre 2,2% e 77,7%), valores superiores aos referidos na gata por Castagnaro *et al.* (1998b), Preziosi *et al.* (1995) e Dias Pereira *et al.* (2004) (valor máximo de 49,7%, 26,5% e 20,6%, respectivamente) mas, todos estes estudos usaram séries mais pequenas. Quando analisámos os vários tipos histológicos, verificámos que os CEMs eram os menos proliferativos, o que está de acordo com lesões de pequenas dimensões de evolução lenta; todos os restantes tipos neoplásicos eram muito proliferativos, em particular os carcinomas metaplásicos. Pelo contrário, estudos prévios na mama da gata não observaram associação do Ki-67 e o tipo histológico (Preziosi *et al.*, 1995; Castagnaro *et al.* 1998b; Dias Pereira *et al.*, 2004). A proliferação baixa nos CEMs pode ser justificada pela capacidade das células mioepiteliais inibirem o crescimento celular, induzindo a interrupção do ciclo celular na transição G₂/M (Adriance *et al.*, 2005), pelos seus efeitos inibidores na angiogénese e também pela síntese de proteases inibidoras como a maspina (Sternlicht *et al.*, 1997; Brasky, 2003; Adriance *et al.*, 2005).

Verificámos também um aumento dos índices de proliferação com o aumento do grau histológico e do estadio, sendo particularmente altos nos carcinomas de grau III e de estadio 3. Na gata, Millanta *et al.* (2002) não obtiveram associação com o grau, porém Dias Pereira *et al.* (2004) observaram uma correlação positiva, mas não significativa; a associação com o grau histológico foi também referida na cadela (Perez Alenza *et al.* 1995; Peña *et al.* 1998) e na mulher (Keshgegian e Cnaan, 1995; Santini *et al.*, 1996; Jensen *et al.*, 2001).

Relativamente à extensão da invasão, observámos um aumento do índice mitótico do carcinoma *in situ* para os carcinomas com invasão do estroma e destes para os com invasão da muscular, mas, não obtivemos associação com o índice de Ki-67. Estes resultados sugerem que existe uma fracção de células detectadas pelo antigénio Ki-67 que não completam o ciclo mitótico; são provavelmente formas abortivas, células que pelo seu alto grau de aberração genómica sofrem apoptose. Vários estudos encontraram associação entre a apoptose e os índices proliferativos em tumores, nomeadamente da mama da mulher (Liu *et al.*, 2001).

Os índices mitótico e de Ki-67 associaram-se de forma significativa com outros critérios clínico-patológicos clássicos: a idade, o tamanho, o padrão de crescimento, a permeação vascular e a metastização. Todos os carcinomas de grandes dimensões, com crescimento infiltrativo, permeação vascular e/ou com metástases ganglionares, evidenciaram valores proliferativos muito superiores aos não associados a estes parâmetros. Os carcinomas com metástases à distância evidenciaram também índices altos. Preziosi *et al.* (1995) encontraram associação entre o índice de Ki-67 e o estadio histológico e obtiveram valores de Ki-67 (mas

não de mitoses) mais elevados em carcinomas de estadio histológico 2, com êmbolos e/ou metástases; estes dados estão de acordo com os resultados por nós obtidos, em que os carcinomas com permeação vascular e metástases apresentaram índices proliferativos mais altos.

Os índices de proliferação associaram-se ainda com a expressão de MMP1 e VEGF, factores que colaboram no estabelecimento de um micro-ambiente favorável ao crescimento tumoral (Chambers e Matrisilian, 1997; Restucci *et al.*, 2002; Nicollini *et al.*, 2004).

Quando comparámos os carcinomas N₀ e N₁ verificámos que os carcinomas N₁ eram significativamente mais proliferativos, o que está de acordo com estudos na mulher (Liu *et al.*, 2001). Quando comparámos os carcinomas primários e as respectivas metástases não observámos diferenças pois todas as lesões eram muito proliferativas.

O índice de Ki-67 é um factor de prognóstico em vários tumores malignos. Na mulher a maioria dos estudos mostra uma forte correlação com a evolução clínica, em análises uni e multivariadas (Jansen *et al.*, 2001; Brown e Gatter, 2002; Nicolini *et al.*, 2004; Zuccari *et al.*, 2004; Zappulli *et al.*, 2005). Na mama da cadela os resultados são controversos mas, alguns estudos revelaram que o índice mitótico (Castagnaro *et al.* 1998b; Queiroga e Lopes, 2002; Zuccari *et al.*, 2004) e de Ki-67 (Castagnaro *et al.* 1998b; Zuccari *et al.*, 2004) são indicadores de prognóstico.

Para o estudo de sobrevivência os carcinomas foram categorizados em muito e pouco proliferativos em função do valor da mediana, à semelhança do referido por Preziosi *et al.* (2002). Ambos os índices proliferativos tiveram significado prognóstico para a sobrevivência total na análise univariada. Gatas com carcinomas com índices proliferativos altos apresentaram uma redução do tempo de sobrevivência; estas diferenças eram bem notórias na sobrevivência total aos 12 meses: a sobrevivência das gatas com índices baixos era mais do dobro da observada nas gatas com índices altos. Outros estudos na mama da gata também referiram que o índice mitótico (Sarli *et al.*, 2003) e o de Ki-67 (Castagnaro *et al.*, 1998b) eram factor de prognóstico. Relativamente à sobrevivência livre de doença, apenas o índice mitótico evidenciou na análise univariada associação com o prognóstico; todavia, observou-se uma forte tendência das gatas com índices de Ki-67 altos a apresentarem piores tempos de sobrevivência, aos 12 meses e no final do período de seguimento.

Na análise multivariada nenhum dos parâmetros obteve significado estatístico. Na bibliografia consultada apenas encontrámos um estudo na mama da gata com análise multivariada: Preziosi *et al.* (1995) obteve valor prognóstico do índices mitótico, mas não do Ki-67, relativamente à sobrevivência total, quer na análise uni quer na multivariada. Esta

diferença de resultados e a escassez de estudos com seguimento revela o quanto é imperativo a realização de novos trabalhos de investigação e em séries mais amplas para validar o valor prognóstico dos índices proliferativos.

Apesar de neste estudo os índices proliferativos não serem critério de prognóstico independente, permitem identificar grupos de gatas com carcinomas associados a maior agressividade biológica e piores tempos de sobrevivência, livre de doença e total, com risco aumentado de morte por cancro de mama.

O primeiro evento da invasão e metastização é a “fuga” das células do tumor primário, que envolve a desregulação da adesão célula a célula (Franchi *et al.*, 1996; Dincer *et al.*, 2001; Gupta *et al.*, 2003; Charpin *et al.*, 2005). A adesão celular é importante numa variedade de processos fisiológicos, como a morfogénese (Behrens, 1999; Han *et al.*, 1999; Vleminckx e Kemler, 1999; Yoshida *et al.*, 2001), a transdução de sinais e a manutenção da estrutura e integridade dos tecidos (Davidson *et al.*, 2000; Bánkfalvi *et al.*, 2002; Charpin *et al.*, 2005) e está também implicada na progressão tumoral (Yoshida *et al.*, 2001; Brunetti *et al.*, 2005). As caderinas medeiam a adesão celular por meio de ligações homotípicas dependentes de cálcio (Jeffers *et al.*, 1997; Wijnhoven *et al.*, 2000; Bánkfalvi *et al.*, 2002; Ozawa, 2002). Foram descritas várias classes de caderinas, das quais a caderina epitelial (E) parece ser o principal mediador de adesão e da integridade epitelial (Berx *et al.*, 1998; Vleminckx *et al.*, 1991; Pignatelli, 1993; Elangbam, 1997; Wheelock *et al.*, 2001).

A **caderina E** é uma glicoproteína transmembranar com 120 kD (Vleminckx *et al.*, 1991), que através do seu domínio citoplasmático, altamente conservado, interage com as cateninas α -, β - e γ -, um grupo de proteínas de ligação que ancoram as moléculas de caderina aos filamentos de actina do citoesqueleto (Shiozaki *et al.*, 1996; Bukholm *et al.*, 1998; Heimann *et al.*, 2000; Rocha *et al.*, 2003; Cowin *et al.*, 2005; Fuchs *et al.*, 2005). O domínio extracelular forma dímeros laterais com as células opostas criando uma estrutura semelhante a um fecho de correr (De Leeuw *et al.*, 1997; Behrens, 1999; Wijnhoven *et al.*, 2000; Lampugnani *et al.*, 2003). O complexo caderina-cateninas é essencial à regulação da adesão e é um componente chave das junções *adherens* (Bukholm *et al.*, 1998; Behrens, 1999; Vallorosi *et al.*, 2000; Nagi *et al.*, 2005). Qualquer alteração na expressão ou na estrutura do complexo caderina-cateninas pode causar alteração da adesão e, consequentemente, o aparecimento do fenótipo invasor (Shiozaki *et al.*, 1996; Bukholm *et al.*, 1998; Wijnhoven *et al.*, 2000; Carico *et al.*, 2001; Chan *et al.*, 2003; Marques *et al.*, 2004; Van de Putte *et al.*, 2004; Nagi *et al.*, 2005). Assim, foi sugerido

que a caderina E (Gamallo *et al.*, 1993; De Leeuw *et al.*, 1997; Han *et al.*, 1999; Kowalski *et al.*, 2003; Fuchs *et al.*, 2005) e as cateninas (Faleiro Rodrigues *et al.*, 2004) actuam como moléculas supressoras dos tumores. Vários estudos mostraram que a expressão aberrante de caderina E estava associada a mau prognóstico em várias tumores do Homem, incluindo a mama (Heimann *et al.*, 2000; Van Aken *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 2001; Gupta *et al.*, 2003; Charpin *et al.*, 2005). Em Medicina Veterinária existem alguns estudos sobre a expressão de caderina E em neoplasias da mama da cadela (Restucci *et al.*, 1997; Brunetti *et al.*, 2003; Reis *et al.*, 2003; Sarli *et al.*, 2005) mas, apenas encontrámos um estudo na mama da gata (Dias Pereira e Gärtner, 2003); em relação à β -catenina, na bibliografia consultada só encontrámos um estudo na mama da cadela (Brunetti *et al.*, 2005).

No nosso estudo observámos expressão preservada de caderina E e β -catenina nas alterações/lesões mamárias sem carácter maligno; a expressão era membranar, de intensidade forte e homogénea. Contrariamente, nos carcinomas a expressão era diminuída, heterogénea e aberrante. A diminuição de caderina E em carcinomas de mama foi referida na gata por Dias Pereira e Gärtner (2003) e está bem documentada na cadela (Brunetti *et al.*, 2003; Reis *et al.*, 2003; Brunetti *et al.*, 2005; Sarli *et al.*, 2005; Matos *et al.*, 2006) e na mulher (Gamallo *et al.*, 1993; Jeffers *et al.*, 1997; Davidson *et al.*, 2000; Acs *et al.*, 2001; Gupta *et al.*, 2003; Charpin *et al.*, 2005). Quando comparámos as lesões adjacentes aos carcinomas observámos o aumento progressivo do fenótipo diminuído e da expressão aberrante de ambas as moléculas de adesão, das alterações fibroquísticas para o CDIS, o que se acentuou nos carcinomas invasores. Siitonen *et al.*, Karayiannakis *et al.* (citados por Turashvili *et al.*, 2005) e Wijnhoven *et al.* (2000) também referiram alteração dos níveis de expressão de caderina E e/ou de β -catenina nas lesões de CDIS. Estas alterações sugerem que, as alterações do complexo caderina E-cateninas são um evento importante na perda de diferenciação celular (Behrens, 1999; Cavallaro *et al.*, 2002) e precedem a invasão (Bukholm *et al.*, 1998).

No nosso trabalho, o fenótipo de caderina E e β -catenina era diminuído na maioria dos carcinomas. A maioria evidenciava expressão citoplasmática aberrante de ambas as moléculas de adesão que, no caso da β -catenina, foi também observada a nível nuclear, o que também foi referido por Brunetti *et al.* (2005) na cadela. A expressão da caderina E associou-se de forma significativa com o grau histológico e com a extensão da invasão, observando-se ainda a tendência ao aparecimento de fenótipo reduzido nos tipos histológicos micropapilar e metaplásico, e em tumores de grandes dimensões. A β -catenina apenas se associou significativamente com o tipo histológico, com fenótipo preservado nos CEMs e reduzido nos

restantes tipos, em particular nos carcinomas metaplásicos. Nenhuma destas moléculas se associou com a permeação vascular ou a metastização.

A relação caderina E/ β -catenina estava mantida e quando a expressão de caderina diminuía era acompanhada por uma diminuição da expressão de β -catenina, o que é consistente com a formação de complexos entre as 2 moléculas de adesão (Yoshida *et al.*, 2001).

Neste estudo analisámos também a expressão de caderina E e β -catenina em simultâneo. Obtivemos fenótipo preservado de ambas as moléculas em apenas 19% dos carcinomas; os restantes apresentavam fenótipo diminuído de pelo menos uma molécula de adesão. O fenótipo de caderina E/ β -catenina associou-se com o tipo histológico e com a invasão. O fenótipo diminuído foi também mais frequente nos carcinomas de alto grau histológico e nuclear, com permeação linfática e metástases ganglionares, o que está de acordo com estudos que demonstram que a perda de caderina E e das cateninas é um passo importante para o aparecimento do fenótipo invasor e metastático (Bukholm *et al.*, 1998; Faleiro Rodrigues *et al.*, 2004).

Quando comparámos os carcinomas N₀ com os N₁ verificámos uma tendência dos carcinomas N₁ a apresentarem fenótipo diminuído e aberrante de caderina E/ β -catenina. Só 33% (6/18) dos carcinomas com fenótipo preservado de ambas as moléculas desenvolveu metástases ganglionares.

A perda da expressão de caderina E pode facilitar a invasão estromal das células mas, neste estudo à semelhança do referido por Jeffers *et al.* (1997), observámos imunomarcagem de ambas as moléculas em células invasoras; esta marcação pode, no entanto, não corresponder à expressão de proteína funcional (Jeffers *et al.*, 1997; Bukholm *et al.*, 1998; Wijnhoven *et al.*, 2000; Cowin *et al.*, 2005), já que a perda de uma das cateninas pode causar inativação da caderina E na ausência de perda de expressão (Jeffers *et al.*, 1997). A maioria dos êmbolos também expressava caderina E e β -catenina. A expressão de caderina E nas metástases e respectivos tumores primários estavam diminuídas mas, algumas metástases re-expressaram caderina E, o que está de acordo com estudos na mama da mulher (Bukholm *et al.*, 1998; Brunetti *et al.*, 2003; Kowalski *et al.*, 2003). Surge assim a ideia que a modelação de caderina E é dinâmica e reversível: a perda da expressão favorece a invasão e a disseminação mas a re-expressão favorece a sobrevivência das células embólicas e o crescimento das células metastáticas (Wijnhoven *et al.*, 2000; Wheelock *et al.*, 2001; Gupta *et al.*, 2003; Kowalski *et al.*, 2003; Cowin *et al.*, 2005). Os mecanismos reversíveis para silenciar a caderina E são provavelmente de natureza epigenéticas, como a hipermetilação do promotor (Acs *et al.*, 2001;

Berx e Van Roy, 2001; Cowin *et al.*, 2005) ou alterações pós-transcripcionais como a fosforilação das cateninas (Van Aken *et al.*, 2001; Wheelock *et al.*, 2001; Cowin *et al.*, 2005).

Relativamente à β -catenina, observámos um aumento do número de casos com expressão diminuída nas metástases (63,6%) relativamente ao tumor primário (50%), o que pode sugerir que esta molécula é um melhor indicador de agressividade biológica que a Caderina E. Contudo, esta diferença requer futuras investigações para avaliar o seu verdadeiro impacto na oncobiologia dos carcinomas da mama da gatas.

No nosso estudo não obtivemos associação com os índices de proliferação, nem com a sobrevivência, livre de doença ou total; contudo, observámos a tendência das gatas com carcinomas de fenótipo diminuído de caderina E a apresentarem piores tempos de sobrevivência livre de doença. Também Brunetti *et al.* (2005) em estudos na mama de cadela não obtiveram associação da caderina E e β -catenina com a proliferação celular nem com a sobrevivência.

Através do seu papel na adesão celular, a β -catenina tem função supressora da invasão (Faleiro Rodrigues, 2005); participa também na via de sinalização Wingless/Wnt (Bukholm *et al.*, 1998; Cavallaro *et al.*, 2002; Bieri *et al.*, 2003; Howe e Brown, 2004; Fuchs *et al.*, 2005). Livre no citoplasma a β -catenina é translocada até ao núcleo onde modula a expressão dos vários genes (Shinohara *et al.*, 1996; Polakis, 1999; Cavallaro *et al.*, 2002; El-Bahrawy *et al.*, 2003; Miyoshi e Hennighausen, 2003; Rios-Doria *et al.*, 2004), envolvidos na proliferação celular, na síntese de MMPs, na carcinogénese e na progressão dos tumores (Van Aken *et al.*, 2001; Conacci-Sorrell *et al.*, 2002; El-Bahrawy *et al.*, 2003). Uma quantidade anormalmente alta de β -catenina no citoplasma, parece indicar uma proteína com potencial oncogénico e, neste estudo observámos um número elevado de carcinomas com expressão citoplasmática e nuclear de β -catenina. Esta dupla função da β -catenina explica a sua actividade supressora dos tumores e oncogénica (Shinohara *et al.*, 1996; Berx *et al.*, 1998; Davidson *et al.*, 2000; Chung *et al.*, 2004; Van de Putte *et al.*, 2004). Outro mecanismo associado ao comportamento invasor é induzido pela ligação do HER-2/*neu*, à β -catenina (Behrens, 1999; Davidson *et al.*, 2000; Hajra e Fearon, 2002). A fosforilação das cateninas por cínases citoplasmáticas e por receptores tirosina cínase, como o HER-2/*neu* está associada a desregulação do complexo Caderina E-cateninas diminuindo a adesão (Hajra e Fearon, 2002; Faleiro Rodrigues, 2005). Neste estudo a maioria dos carcinomas HER-2 positivos apresentava diminuição da expressão de β -catenina e caderina E.

A angiogénese é o processo de formação de novos vasos a partir da rede vascular pré-existente (Fox *et al.*, 1995; Fox *et al.*, 1997; Moses, 1997; Nakopoulou *et al.*, 2002; Viacava *et al.*, 2004; Tlsty e Coussens, 2006). É um processo fisiológico estreitamente regulado pelo balanço entre múltiplos factores estimuladores e inibidores (Fox *et al.*, 1996; McMahon, 2000; Foekens *et al.*, 2001; Pidgeon *et al.*, 2001; Valente *et al.*, 2006; Tlsty e Coussens, 2006). A angiogénese é fundamental durante o desenvolvimento embrionário (Ferrara e Davis-Smyth, 1997; Conti, 2002; Lampugnani *et al.*, 2003; Loureiro *et al.*, 2005), bem como no período pós-natal (Ferrara e Davis-Smyth, 1997; Ferrara, 2001; Lincoln II *et al.*, 2003); está também implicado no crescimento e invasão tumoral, sendo parte integrante da cascata metastásica (Gasparini *et al.*, 1997; Linderholm *et al.*, 2000; Garvin e Dabrosin, 2003; Turashvili *et al.*, 2005).

A família de factores de crescimento endotelial regula a vasculogénese, angiogénese e a linfangiogénese (Pepper, 2001; Dvorak, 2002). O factor de crescimento endotelial (VEGF) é um factor mitogénico muito específico e selectivo (Maeda *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2000; Wen *et al.*, 2002; Konecny *et al.*, 2004) e factor de sobrevivência das células endoteliais (Brown *et al.*, 1995; Lewis *et al.*, 2000; Gunningham *et al.*, 2000; Pidgeon *et al.*, 2001; Xie *et al.*, 2004). Induz a migração das células endoteliais (Gasparini *et al.*, 1997; Nicolini *et al.*, 2004; Viacava *et al.*, 2004) e causa a degradação do estroma através da activação de enzimas proteolíticas envolvidas na angiogénese e na invasão (Gasparini *et al.*, 1997; Restucci *et al.*, 2002; Tlsty e Coussens, 2006). O VEGF é uma proteína de 34-50 kD que se liga a um ou mais receptores tirosina cínase transmembranares KDR/Flk-1 (VEGFR-1) e Flt-1 (VEGFR-2) (Gasparini, 2000; Foekens *et al.*, 2001; Sweeney *et al.*, 2002; Lampugnani *et al.*, 2003) e Flt-4 (VEGFR-3) (Gunningham *et al.*, 2000; Lewis *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*, 2005) que são expressos de forma selectiva, nas células endoteliais (Gasparini *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 2000; Orlandini *et al.*, 2003; Viacava *et al.*, 2004). Todos os tecidos orgânicos são capazes de produzir VEGF (Nicolini *et al.*, 2004) mas, este é sintetizado principalmente por células endoteliais, fibroblastos, macrófagos (Leek *et al.*, 2000; Restucci *et al.*, 2002). As células neoplásicas expressam níveis altos de VEGF (Foekens *et al.*, *et al.*, 2001; Sweeney *et al.*, 2002; Restucci *et al.*, 2002; Nicolini *et al.*, 2004) que tem efeito autócrino, estimulando o seu crescimento (McMahon, 2000; Kawai *et al.*, 2002; Restucci *et al.*, 2002), e parácrino, através dos receptores presentes nas células endoteliais (Restucci *et al.*, 2002). Os neovasos fornecem nutrientes e oxigénio para o crescimento tumoral (Restucci *et al.*, 2002; Nicollini *et al.*, 2004) e as enzimas segregadas pelas células endoteliais em migração e pelas células tumorais degradam a matriz extracelular favorecendo a migração endotelial (Tlsty e Coussens, 2006) e a disseminação das

células tumorais para a circulação (Weidner, 1998; Takahashi *et al.*, 1995; Restucci *et al.*, 2002).

Neste estudo o VEGF estava expresso em todos os tipos de alterações/lesões mamárias. A expressão aumentou significativamente das alterações sem carácter maligno para as neoplasias malignas, o que está de acordo com outros estudos (Takahashi *et al.*, 1995; Obermair *et al.*, 1997; Milanta *et al.*, 2002b; Viacava *et al.*, 2004). Porém, foi inferior nas neoplasias benignas que nas alterações não neoplásicas, o que é justificado pela expressão alta de VEGF nas alterações fibroadenomas, quer no componente epitelial quer estromal.

Quando comparámos os carcinomas e as lesões adjacentes observámos um aumento progressivo da expressão de VEGF das alterações fibroquísticas para os CDIS e destes para os carcinomas invasores, que foi significativo do ponto de vista estatístico. Expressão de VEGF alta em CDIS foi referida por vários estudos (Adams *et al.*, 2000; Gasparini, 2000; Guidi *et al.*, 2000; Gunningham *et al.*, 2000), e revela que o estímulo angiogénico surge antes do aparecimento do fenótipo invasor (Brown *et al.*, 1995; Sternlicht e Werb, 2001).

Nos carcinomas a expressão de VEGF associou-se de forma significativa com o tipo e o grau histológico, o grau nuclear e o estadio. Salientaram-se os CEMs com expressão baixa e os carcinomas metaplásicos com índice alto na totalidade da série. Também Millanta *et al.* (2002b) encontraram associação entre expressão de VEGF e o tipo histológico dos carcinomas da gata (em particular com o tipo papilar) e com o grau. A maioria dos estudos analisados na mama da mulher não obteve associação entre a expressão de VEGF e os critérios clínico-patológicos convencionais (Gasparini *et al.*, 1997; Obermair *et al.*, 1997; Adams *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2000).

A expressão de VEGF também se associou com a necrose; na periferia das áreas de necrose era frequente observar extensa e intensa expressão de VEGF nas células tumorais, o que também foi referido por Restucci *et al.* (2002) na mama da cadela. Este facto pode estar associado à hipoxia, situação em que há um aumento da síntese e da libertação de citocinas pró-angiogénicas pelas células tumorais e pelos macrófagos (Gasparini, 2000; Leek *et al.*, 2000; Konecny *et al.*, 2004). Observámos também associação com a permeação vascular e com a metastização ganglionar, o que não foi referido por Millanta *et al.* (2002b) na gata. A associação entre a expressão de VEGF e a permeação vascular era previsível, uma vez que a metastização depende da capacidade das células tumorais induzirem angiogénese e/ou linfangiogénese (Smith *et al.*, 2000; Tse *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2005). Quando comparámos os carcinomas N₀ e os N₁ verificámos uma forte associação com o envolvimento ganglionar: todas as gatas com gânglios positivos evidenciavam VEGF alto; porém Linderholm

et al. (2000), na mama da mulher não obteve diferenças entre carcinomas N₀ e os N₁ (Linderholm *et al.*, 2000). Não se observaram diferenças entre os tumores primários e as suas metástases pois todos (excepto uma metástase) evidenciaram VEGF alto. Os nossos resultados estão em concordância com a literatura que sugere que tumores com sobre-expressão de VEGF têm risco acrescido de doença metastásica (Smith *et al.*, 2000; Restucci *et al.*, 2002). As células metastásicas ou das recidivas estão programadas geneticamente para iniciar a angiogénese e, aparentemente, podem promovê-la imediatamente após a implantação, contrariando o conceito clássico da latência das micrometástases sem potencial angiogénico (Vajkoczy *et al.*, 2002).

Constatámos também que os carcinomas com infiltrado inflamatório moderado a abundante evidenciaram frequentemente índice alto de VEGF. Este factor além de estimular directamente a angiogénese tumoral, pode ter um efeito indirecto por ser quimiotático para os macrófagos, que cooperam com as células tumorais na vascularização produzindo VEGF (Leek *et al.*, 2000; Lewis *et al.*, 2000; Yu e Rak, 2003). No entanto, a ausência de associação estatística pode sugerir que as células inflamatórias não desempenham um papel preponderante na promoção da angiogénese nos carcinomas da mama da gata.

A expressão de VEGF associou-se com os índices mitótico e de Ki-67. Esta relação era teoricamente esperada pelo efeito autócrino do VEGF nas células tumorais (Gasparini *et al.*, 1997; De Jong *et al.*, 1998; Nakopoulou *et al.*, 2002; Donadio *et al.*, 2005), e porque o suporte vascular é necessário para o crescimento tumoral (Gasparini *et al.*, 1997; Valente *et al.*, 2006). A expressão de VEGF associou-se também com a expressão de MMP2 e TIMP1 mas não de MMP1 e de HER2/*neu*. O aumento da expressão de TIMP1 pode ser uma resposta à proteólise aumentada promovida pela MMP2 e não ao aumento de VEGF já que o TIMP1 é uma molécula conhecida pelos seus efeitos anti-angiogénicos, por inibir a proliferação e migração endotelial (Nakopoulou *et al.*, 2002).

A expressão de VEGF não teve valor prognóstico para a sobrevivência. Contudo, verificou-se a tendência das gatas com carcinomas de índice alto a apresentarem piores tempos de sobrevivência livre de doença e total, o que está de acordo com o observado por Milanta *et al.* (2002b). A associação do VEGF e a sobrevivência no cancro de mama da mulher é controversa (Lee *et al.*, 2002); em alguns estudos o VEGF foi factor de prognóstico independente para a sobrevivência (Gasparini *et al.* 1997; Wen *et al.* 2002) mas outros não obtiveram estas associações (Obermair *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2002).

O VEGF é a principal via angiogénica no cancro de mama da mulher e provavelmente da gata mas, a vascularização tumoral é um processo dinâmico, complexo e multifactorial (Leek *et al.*, 2000; Vajkoczy *et al.*, 2002; Viacava *et al.*, 2004). Apesar de não terem atingido

significado estatístico relativamente à sobrevivência, os índices altos de VEGF identificam um grupo de gatas associadas a doença biologicamente muito agressiva (grau histológico e nuclear altos, índices mitótico e de Ki-67 altos, permeação vascular e metastização ganglionar no momento da cirurgia) que potencialmente podem beneficiar com uma terapêutica molecular direccionada contra oVEGF e/ou os seus receptores.

A invasão e a metastização das células tumorais são processos complexos mas, os primeiros passos desta cascata de eventos envolvem interacções célula-matriz, degradação e migração na matriz extracelular, que permitem passar de uma lesão *in situ* a invasora (Basset *et al.*, 1997; Sternlicht e Werb, 2001). A capacidade para degradar a matriz extracelular implica na biologia dos tumores uma família de proteases denominadas metaloproteinases da matriz (MMPs) (Basset *et al.*, 1997; Jones e Walker, 1997; Nakopoulou *et al.*, 2003; Torng *et al.*, 2004). Outras questões a que nos propusemos responder foram: Qual a importância das metaloproteinases da matriz 1 (MMP1) e MMP2 e do inibidor tecidual das metaloproteinases-1 (TIMP1) no comportamento biológico dos carcinomas de mama da gata?

As metaloproteinases da matriz são enzimas proteolíticas que estão implicadas em vários aspectos biológicos nomeadamente a proliferação e diferenciação celular (Vu e Werb, 2000; Chang e Werb, 2001; Coussens *et al.*, 2002), a remodelação da matriz extracelular (Murray *et al.*, 1998; Kurahara *et al.*, 1999; Leppä *et al.*, 2004), a vascularização e migração celular (Chang e Werb, 2001; Borg, 2004), a apoptose (Vu e Werb, 2000; Coussens *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2005) e a conversão maligna (Coussens *et al.*, 2002). Estão envolvidas no desenvolvimento (Giannelli *et al.*, 1997; Fata *et al.*, 2004) e a involução da glândula mamária (Johnsen *et al.*, 1998; Green e Lund, 2005) e em vários processos patológicos associados a proteólise inapropriada (Sternlicht e Werb, 2001; Loo *et al.*, 2004).

As metaloproteinases são produzidas principalmente por fibroblastos (Basset *et al.*, 1997; Sternlicht e Werb, 2001) sob a forma de zimogéneos (Nelson *et al.*, 2000; Coussens *et al.*, 2002; Sternlicht e Werb, 2001). A sua actividade é rigorosamente regulada desde a transcrição, à activação dos zimogéneos e inibidores (Chambers e Matrisilian, 1997; Moses, 1997; Jones *et al.*, 1999; Coussens *et al.*, 2002; Green e Lund, 2005). Em condições fisiológicas o balanço entre as MMPs e os seus inibidores é essencial para a homeostasia da matriz extracelular (Hirayama *et al.*, 2002).

Foram descritos 4 membros de inibidores tecidulares das metaloproteinases (TIMP1 a 4) que apesar de inibirem a actividade de várias MMPs são relativamente específicos (Moses, 1997; Kurahara *et al.*, 1999; Nakopoulou *et al.*, 2003). Os TIMPs exercem um duplo controlo sobre as MMPs inibindo as MMPs activadas e inibindo a sua activação (Hidalgo e Eckhardt, 2001). O TIMP1 é considerado o maior regulador da actividade das MMPs nos tecidos (Stamenkovic, 2000; Hirayama *et al.*, 2002).

Vários estudos sugerem que as células do estroma cooperam com as células tumorais no estabelecimento de um micro-ambiente propício à invasão (Chambers e Matrisilian, 1997; Coussens *et al.*, 2002; DeClerck *et al.*, 2004; Loo *et al.*, 2004). Nas neoplasias as MMPs são produzidas principalmente por células do estroma mas, a sua expressão é regulada pelas células neoplásicas através de citocinas (Nelson *et al.*, 2000; Hidalgo e Eckhardt, 2001), quimiocinas, EMMPRIN (“*extracellular matrix metalloprotease inducitor*”) (Jones e Walker, 1997; Johansson *et al.*, 2000; Chang e Werb, 2001) e/ou o TCSF (“*Tumor cell-derived collagenase stimulatory factor*”) (Papparella *et al.*, 2002). As MMPs contribuem potencialmente em todas as fases da evolução neoplásica (Johansson *et al.*, 2000; Sternlicht e Werb, 2001) sendo particularmente importantes na metastização, onde a capacidade das células invadirem e crescerem num órgão particular depende da sua capacidade para induzir ou activar MMPs locais (Brown, 1998; Stamenkovic, 2000).

As MMPs estão associadas à invasão em vários tipos tumorais mas, uma das mais implicadas na progressão do cancro é a MMP2 (gelatinase A) (Basset *et al.*, 1997; Grieu *et al.*, 2004) por degradar o colagéneo IV das membranas basais (Murray *et al.*, 1998; Talvensaarimattila *et al.*, 1998). Níveis altos de MMP2 foram associados a invasão e mau prognóstico em carcinomas da mama, do pulmão, da próstata, cólon e estômago (Johansson *et al.*, 2000; Nakopoulou *et al.*, 2003), da bexiga (Torng *et al.*, 2004) e da cavidade oral (Kurahara *et al.*, 1999; Loukopoulos *et al.*, 2003). Em oncologia veterinária a expressão de MMP2 foi referida em neoplasias mamárias, osteossarcomas e mastocitomas de canídeos (Loukopoulos *et al.*, 2003).

Após degradar a membrana basal as células têm que atravessar o estroma, rico em colagéneo tipo I e III, o que requer a acção de collagenases intersticiais, em particular a MMP1 (Benbow *et al.*, 1999; Pardo e Selman, 2005). Esta é uma molécula ubiquitária produzida principalmente por fibroblastos (Benbow *et al.*, 1999; Johansson *et al.*, 2000) e foi associada a mau prognóstico no cancro colorectal e do esófago (Murray *et al.*, 1998; Johansson *et al.*, 2000).

Se as MMPs podem actuar como promotores naturais dos tumores, os seus inibidores devem ter efeito contrário, inibindo a invasão e a metastização (Kurahara *et al.*, 1999; Sternlicht e Werb, 2001; Xu *et al.*, 2005). Porém, vários estudos no Homem referiram que os TIMPs estão sobre-expressos em tumores, o que está frequentemente associado a mau prognóstico (Yoshiji *et al.*, 1998; Määttä *et al.*, 2000; Miyata *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005). Alguns autores encontraram uma relação directa entre os níveis de TIMP1 e a neovascularização, o crescimento tumoral e a proliferação (Stamenkovic, 2000; Sternlicht e Werb, 2001).

No nosso estudo observámos um aumento da expressão de MMPs nas neoplasias malignas relativamente às alterações sem características de malignidade, o que também foi referido por Loukopoulos *et al.* (2003) na cadela e por Jones *et al.* (1999) e Määttä *et al.* (2000) na mama da mulher. Verificámos que as alterações não neoplásicas, em particular as alterações fibroadenomas, lesões com extensa ramificação ductal, expressavam de forma constante níveis de imunoreactividade altos de MMP1, MMP2 e TIMP1, enquanto as neoplasias benignas expressavam níveis baixos. Quando analisámos as lesões adjacentes aos carcinomas verificámos novamente um aumento da expressão de MMPs e TIMP1 das alterações fibroquísticas para os carcinomas *in situ* e destes para os invasores. Quando comparámos as alterações fibroquísticas associadas a carcinomas com as solitárias verificámos que estas últimas evidenciavam frequentemente sobre-expressão de MMPs; estas células apesar de não evidenciarem alterações microscópicas evidenciavam maior actividade enzimática sugestiva de serem lesões em evolução no processo de cancerização. Estas lesões deverão ser submetidas a vigilância clínica mas, novos estudos são necessários para confirmar a sua importância na história natural das lesões de mama da gata.

Neste estudo observámos expressão forte de MMPs e TIMP1 sob a forma granular ou difusa, no citoplasma das células tumorais, nos fibroblastos e nas células inflamatórias, o que foi referido por Papperella *et al.* (2002) e Loukopoulos *et al.* (2003) em neoplasias caninas e está extensamente descrito na bibliografia de Medicina Humana. Contudo, na bibliografia consultada, não encontramos nenhum estudo na mama da gata. Relativamente à MMP2 observou-se expressão constante nas células mioepiteliais das alterações não neoplásicas, neoplasias benignas e malignas. A expressão nas células mioepiteliais é o reflexo da sua acção na formação e remodelação das membranas basais da mama (Jones *et al.*, 1999).

A expressão de MMP1 foi detectada na totalidade dos carcinomas. A sobre-expressão desta molécula associou-se com a ulceração, o tipo e o grau histológico, o que foi referido por Garbett *et al.* (2000) na mama da mulher. Associou-se ainda com o grau nuclear, mas não com

a extensão da invasão ou o envolvimento ganglionar. A expressão de MMP1 associou-se também com os índices de proliferação, o que pode dever-se ao aumento da biodisponibilidade de factores de crescimento retidos na matriz extracelular e libertados por proteólise mediada por esta colagenase. Vários estudos têm demonstrado a existência de níveis altos de MMP1 no cancro de mama, quer nas células neoplásicas quer estromais e na interface tumor:estroma, sugerindo uma interacção directa entre estes 2 tipos celulares (Jia *et al.*, 2004).

A expressão de MMP2 foi observada na totalidade da série. A expressão era forte e extensa nas células neoplásicas, e menos evidente na mama não neoplásica adjacente e no estroma tumoral, o que também foi referido por Papparella *et al.* (2002), Loukopoulos *et al.* (2003) e Pellikainen *et al.* (2004). A expressão era citoplasmática e por vezes membranar, o que reflecte a via de activação desta proteína ao nível da membrana celular por actuação da Metaloproteinase associada à membrana de tipo 1 (MT1-MMP) (Jones *et al.*, 1999; Papparella *et al.*, 2003). Esta localização nas células tumorais é controversa (Basset *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 1999; Nakopoulou *et al.*, 2003; Torng *et al.*, 2004). Estudos de imuno-histoquímica têm localizado a expressão de MMP2 nas células neoplásicas mas, estudos de hibridação *in situ* demonstram a expressão do ARNm nas células estromais (Määttä *et al.*, 2000; Pellikainen *et al.*, 2004). Esta discrepância pode ser explicada pela internalização do complexo MMP2/TIMP2/MT1-MMP após a activação a nível da membrana, resultando na acumulação de produtos imunorreactivos no citoplasma das células neoplásicas (Jones *et al.*, 1999).

Neste estudo não observámos associação da expressão de MMP2 com o tipo histológico, nem com o envolvimento ganglionar. A maioria dos carcinomas evidenciou sobre-expressão, em particularmente os carcinomas micropapilares e metaplásicos; contudo, a maioria dos CEMs evidenciava MMP2 alto, devido à expressão desta metaloproteinase pelas células mioepiteliais. Constatámos ainda que a maioria dos carcinomas metastásicos evidenciou sobre-expressão de MMP2.

Obtivemos uma forte associação entre a expressão de MMP2 e o grau histológico mas Papparella *et al.* (2002) e Loukopoulos *et al.*, (2003) em estudos na mama da cadela não obtiveram esta associação. Não encontrámos associação com os índices de proliferação celular mas obtivemos associação com a expressão de VEGF e TIMP1.

Vários estudos em cancro de mama da mulher também não correlacionaram a expressão de MMP2 com os critérios clínico-patológicos (Pellikainen *et al.*, 2004) ou encontraram apenas com alguns parâmetros como o tamanho (Loukopoulos *et al.*, 2003; Nakopoulou *et al.*, 2003; Grieu *et al.*, 2004), o grau (Garbett *et al.*, 2000; Grieu *et al.*, 2004; Pellikainen *et al.*, 2004), o

envolvimento ganglionar (Jones *et al.* 1999; Griez *et al.*, 2004), a proliferação celular (Chang e Werb, 2001; Miyata *et al.*, 2004) e a expressão de VEGF (Chang e Werb, 2001).

A expressão de TIMP1 ocorreu na totalidade da série de carcinomas principalmente nas células neoplásicas, o que também foi referido por Garbett *et al.* (2000) e por Johansson *et al.* (2000) na mulher. O TIMP1 associou-se com o tipo histológico a extensão da necrose e a abundância do infiltrado, mas não com os restantes parâmetros clínico-patológicos; assim, verificámos que a expressão era maior em carcinomas micropapilares e metaplásicos enquanto a maioria dos CEM evidenciou expressão baixa. Observou-se ainda tendência ao aumento da expressão com o aumento do grau histológico e do estadio.

A expressão de TIMP1 associou-se com a abundância do infiltrado inflamatório, o que pode sugerir que estas células têm papel importante na síntese de MMPs e TIMPs e/ou estimulam a síntese de MMPs pelas células tumorais (Benaud *et al.*, 1998). Apesar do efeito promotor do crescimento do TIMP1 (Chambers e Matrisilian, 1997; Yoshiji *et al.*, 1998) não obtivemos associação com os índices de proliferação. A expressão de TIMP1 associou-se com a expressão de VEGF, comprovando as suas propriedades pró-angiogénicas referidas por vários estudos (Yoshiji *et al.*, 1998; Miyata *et al.*, 2004).

Quando comparámos os carcinomas N₀ e N₁ ou os tumores primários e as respectivas metástases não se observaram diferenças pois todos evidenciaram sobre-expressão de MMPs e TIMP1. Quando analisámos os casos com metástases à distância verificámos que todos evidenciavam MMP1 e MMP2 altos mas TIMP1 baixo, o que sugere que a relação MMPs:TIMPs pode ter papel importante na disseminação neoplásica. Também Kurahara *et al.* (1999) observaram diminuição de TIMP1 nos casos associados a metástase.

Quando analisámos o valor prognóstico destes marcadores relativamente à sobrevivência, livre de doença e total, verificámos uma tendência clara dos carcinomas com sobre-expressão de MMP1 e MMP2 a apresentarem piores tempos de sobrevivência, sendo os efeitos mais notórios na sobrevivência livre de doença. Estes resultados estão de acordo com estudos no cancro de mama da mulher que associaram a expressão de MMP2 a elevada agressividade biológica e baixo tempo de sobrevivência (Talvensaari-Mattila *et al.*, 1998; Pellikainen *et al.*, 2004). Relativamente ao TIMP1 a sobre-expressão reflectiu-se principalmente na diminuição do tempo de sobrevivência livre de doença, o que também foi observado nas gatas N₀.

Neste estudo a sobre-expressão de MMPs e TIMP1 associou-se principalmente ao carácter maligno das lesões o que nos leva a concluir, à semelhança de Hirayama *et al.*, 2002, que estas proteínas desempenham papel importante no comportamento biológico agressivo dos carcinomas da mama da gata. A análise da sobrevivência demonstra claramente que as gatas

com sobre-expressão de MMP1 e MMP2 evidenciam risco acrescido de progressão da doença e/ou morte por cancro, o que sugere, à semelhança da Medicina Humana (Brown, 1998; Hidalgo e Eckhardt, 2001; Sternlicht e Werb, 2001; Wolf *et al.*, 2003), que estas gatas podiam beneficiar de terapias moleculares dirigidas contra as MMPs.

Em Medicina Humana a utilização do anticorpo monoclonal humanizado Trastuzumab (Herceptin[®]) em pacientes com cancro de mama metastático, fez com que o proto-oncogene HER-2/*neu* passasse a desempenhar um papel central entre os marcadores moleculares estudados no cancro de mama da mulher (Jacobs *et al.*, 1999; Press *et al.*, 2002; Milanezi, 2005). O HER-2/*neu* codifica uma glicoproteína transmembranar de 185 kD com actividade tirosina cínase, que se encontra sobre-expressa em 10 a 30% dos carcinomas invasores da mama (Pauletti *et al.*, 2000; Press *et al.*, 2002; Ellis *et al.*, 2003; Lear-Kaul *et al.*, 2003; Ross *et al.*, 2003; Konecny *et al.*, 2004; Maru *et al.*, 2005; Milanezi, 2005); em 85 a 90% dos casos a sobre-expressão é devida à amplificação do gene (Pauletti *et al.*, 2000; Martín de las Mulas *et al.*, 2003; Milanezi, 2005). A maioria dos estudos refere que a amplificação do gene ou a sobre-expressão da proteína tem valor prognóstico para a evolução do cancro de mama na análise uni ou multivariada mas, outros estudos não observaram qualquer associação (Press *et al.*, 2002; Ross *et al.*, 2003; Milanezi, 2005).

O HER-2 é um receptor membranar que devido à sua elevada homologia estrutural, pertence à família do receptor do factor de crescimento epidérmico (EGFR) (Roetger *et al.*, 1998; Walker, 1998; Masood e Bui, 2002; Ross *et al.*, 2003; Dahlberg *et al.*, 2004; Milanezi, 2005). Estes receptores participam na comunicação célula-célula e célula-estroma através da transdução de sinais (Ross *et al.*, 2003). Quando um factor de crescimento específico (ligando) se liga a um membro da família EGFR, o receptor forma dímeros com vários membros da família (EGFR ou HER-1, HER-2, HER-3 ou HER-4) (Ross *et al.*, 2003; Milanezi, 2005). A fosforilação dos dímeros resulta numa cascata de sinais e activação de vários genes, com importância na apoptose (Dahlberg *et al.*, 2004), no crescimento celular e no estado de transformação celular (Ross *et al.*, 2003; Milanezi, 2005). Apesar de não ser conhecido o factor de crescimento que se liga ao receptor HER-2 (Ellis *et al.*, 2003; Ross *et al.*, 2003; Milanezi, 2005), este forma dímeros de forma preferencial com vários membros da família do EGFR; estes dímeros são mais estáveis, induzindo uma sinalização mais potente e prolongada (Ménard *et al.*, 2000; Ross *et al.*, 2003; Milanezi, 2005), aumentando a proliferação e a migração das células (Roetger *et al.*, 1998; Milanezi, 2005). A expressão do HER-2 é baixa nos tecidos normais dos adultos, mas homogénea na maioria dos tumores positivos, tornando esta molécula

um bom alvo para as terapêuticas direcionadas contra os receptores tirosina-cínase (Milanezi, 2005).

O HER-2 pode ser avaliado ao nível do ADN, averiguando a existência de amplificação por FISH (Hibridação *in situ* pela fluorescência), CISH (Hibridação *in situ* por cromogéneo), PCR (“*Polimerase Chain reaction*”) ou Southern Blot, ao nível do ARNm através de Northern blot, ou ao nível da expressão da proteína, por imuno-histoquímica ou Western blot. As técnicas mais usadas são o FISH e a imuno-histoquímica (Masood e Bui, 2002; Milanezi, 2005).

Neste estudo observámos sobre-expressão de HER-2 em 18% dos carcinomas da mama da gata, valor que está de acordo com o referido por Martín de las Mulas *et al.* (2003) na mama de cadela (17,6%) e ao referido para a mama da mulher, como já foi acima mencionado. Além da expressão membranar, na maioria da série a proteína HER-2 foi observada no citoplasma das células neoplásicas que é considerada negativa. A expressão citoplasmática pode estar associada a desregulação dos mecanismos de transporte e processamento desta proteína transmembranar.

Apesar de não termos observado sobre-expressão de HER-2 na mama não neoplásica e neoplasias benignas, De Maria *et al.* (2005) observaram expressão ocasional em neoplasias benignas da mama da gata. Na mulher, a expressão de HER-2 em neoplasias benignas, mesmo em níveis baixos, está associada com risco aumentado de desenvolver cancro de mama invasor (Ross *et al.*, 2003).

Quando analisámos o tipo histológico, observámos tendência à sobre-expressão ocorrer nos mesmos tipos que na mulher: a expressão foi rara no carcinoma metaplásico (o que foi descrito por Khan *et al.* (2003), Kochhar *et al.* (2005) e Reis-Filho *et al.* (2005)), mas foi frequente nos carcinomas micropapilares (50%) (o que também foi referido por Paterakos *et al.* (1999) (60%) e Zekioglu *et al.* (2004) (54%)). Apesar de nesta série o CDI-STE ter sido o segundo tipo histológico com sobre-expressão mais frequente de HER-2 (18,5%), o valor é muito inferior ao referido para este tipo histológico na mulher (40 a 60%) (Milanezi, 2005). O carcinoma papilar *in situ* foi negativo mas, na mama humana, a sobre-expressão de HER-2 em lesões de *cis* é superior à dos carcinomas invasores (Ménard *et al.*, 2000).

Observou-se ainda a tendência dos carcinomas positivos ao HER-2 apresentarem grau nuclear alto, estadio avançado, permeação vascular e índices proliferativos altos, critérios classicamente associados a evolução desfavorável. Estudos na mama da cadela também demonstraram associação entre a expressão de HER-2 e o prognóstico (Martín de las Mulas *et al.*, 2003; De Maria *et al.*, 2005). Na mulher a amplificação do gene ou a sobre-expressão

proteica de HER-2 associa-se de forma consistente com o grau histológico alto, taxas de proliferação elevadas e ausência de receptores hormonais (Ross *et al.*, 2003; Milanezi, 2005).

A sobre-expressão desta proteína também se associou com maior frequência a sobre-expressão de MMP1, MMP2 e VEGF. Vários estudos em Medicina Humana observaram associação entre os níveis de VEGF e de HER-2 em vários tumores nomeadamente na mama, ovário, cabeça e pescoço e pulmão (Xie *et al.*, 2004). O gene HER-2 pode mediar a angiogénese por regular a transcrição de VEGF (Lee *et al.*, 2002; Konecny *et al.*, 2004; Loureiro *et al.*, 2005), sugerindo que o fenótipo mais agressivo associado à sobre-expressão de HER-2/*neu* na mama é, em parte, atribuída ao aumento da angiogénese (Konecny *et al.*, 2004; Loureiro *et al.*, 2005).

Quando comparámos tumores N₀ e N₁ verificámos que apenas 23% dos carcinomas N₁ evidenciaram sobre-expressão de HER-2; quando comparámos os tumores primários e as suas metástases verificámos que 2 das 3 metástases positivas ao HER-2 tiveram origem em tumores positivos. Apesar de alguns autores defenderem que a expressão de HER-2 na maioria das metástases mostra concordância com o tumor primário (Milanezi, 2005), outros defendem que podem ser discordantes já que o clone metastásico pode não ser representativo no tumor primário (Lear-Kaul *et al.*, 2003).

Os estudos do conteúdo de ADN fornecem informações úteis sobre as características biológicas de um vasto número de neoplasias humanas (Merkel *et al.*, 1987) e animais (Seixas, 2000; Oliveira *et al.*, 2005). A aneuploidia de ADN está bem documentada em neoplasias malignas (Destexhe *et al.*, 1995) mas, o significado prognóstico da ploidia de ADN no cancro de mama da mulher é controverso (Duigou *et al.*, 2000; Sidoni *et al.*, 2001). Enquanto alguns autores referem que a aneuploidia é um critério desfavorável (Destexhe *et al.*, 1995; Sidoni *et al.*, 2001), outros não encontraram qualquer diferença na agressividade biológica entre tumores diplóides e aneuplóides (Cohen, 1996; Lorenzato *et al.*, 2000; Sidoni *et al.*, 2001). Muitos dos trabalhos analisados são de citometria de fluxo, porém, a maioria dos estudos comparativos entre esta técnica e a citometria de imagem obteve resultados similares (Destexhe *et al.*, 1995; Ottesen *et al.*, 1997; Reles *et al.*, 1998; Jaszcz-Gruchala *et al.*, 2001). Em Medicina Veterinária encontrámos referência a 3 estudos da ploidia de ADN em carcinomas de mama da gata (Minke *et al.*, 1990).

Da totalidade da série de carcinomas (n=94), obtivemos histogramas interpretáveis em 99% dos casos, valor similar ao referido para a mama da mulher usando citometria de fluxo (91% a 99,7%) (Duigou *et al.*, 2000; Moureau-Zabbotto *et al.*, 2005). Lembramos que a fixação

induz alterações na cromatina, pelo que esta técnica requer o controlo rigoroso das condições de fixação (Weid *et al.*, 1989), o que nem sempre foi possível.

Neste estudo 67% dos carcinomas evidenciaram conteúdo de ADN aberrante, valor superior ao referido na mama da gata por Minke *et al.* (1990) (39%) mas similar à obtida por Prop *et al.* (1986) (61%) (citado Minke *et al.*, 1990) e à referida por Misdorp (2002) (62%), em estudos de citometria de fluxo. Esta frequência de aneuploidia é superior à referida para a mama da cadela (entre 37% e 62%) (Destexhe *et al.*, 1995; Pérez Alenza *et al.*, 1995; e Rutteman *et al.*, 1988) e da mulher (entre 45% e 80%) (Tanner *et al.*, 1998; Sidoni *et al.*, 2001; Martinez-Arribas *et al.*, 2005; Moureau-Zabotto *et al.*, 2005). Quando separámos o padrão aneuplóide do multiplóide de ADN verificámos que 30% dos casos eram multiplóides, valor superior aos 7% referidos na gata (Minke *et al.*, 1990) e aos 8 a 17% relatados na cadela (Minke *et al.*, 1990; Pérez Alenza *et al.*, 1995).

Quando analisámos o conteúdo de ADN das lesões adjacentes aos carcinomas verificámos um aumento do padrão aneuplóide com a transformação tecidular, das alterações fibroquísticas para os carcinomas *in situ* e destes para os invasores. As alterações fibroquísticas eram todas diplóides mas, há referências de alterações e neoplasias benignas da mama aneuplóides de ADN (Rutteman *et al.*, 1988; Minke *et al.*, 1990; Destexhe *et al.*, 1995). A aneuploidia em lesões de *cis* está também bem documentada na mulher (Sidoni *et al.*, 2001; Ottesen, 2003). No estudo de Ottesen (2003) mais de 80% das lesões de *cis* eram aneuplóides com um padrão de distribuição similar ao observado em carcinomas invasores, o que sugere que o padrão de ADN já está estabelecido nas fases pré-invasoras (Ottesen, 2003).

Quando comparámos a ploidia de ADN com o tipo histológico dos carcinomas constatámos que a maioria dos CEMs era diplóide de ADN, o que está de acordo com estudos em CEMs das glândulas salivares (Foschini *et al.*, 2003). O único CEM multiplóide de ADN observado era uma lesão bifásica cujo componente epitelial sofreu indiferenciação originando um carcinoma micropapilar invasor. Quando analisámos separadamente as áreas bifásicas e micropapilares verificámos que as primeiras eram diplóides e as segundas multiplóides de ADN. A maioria dos outros tipos histológicos evidenciou tendência a apresentar conteúdo de ADN aneuplóide, salientando-se os carcinomas metaplásicos com a maior frequência de padrão multiplóide.

Observámos um aumento significativo da frequência do padrão multiplóide com o aumento do grau histológico e nuclear, e com o aumento do índice mitótico, mas não com a invasão ou a permeação vascular. A maioria dos carcinomas N₁ (73%) evidenciava conteúdo de ADN aberrante, porém a diferença entre carcinomas N₀ e N₁ não foi significativa. As

metástases evidenciaram maior frequência do padrão multiplóide que os tumores primários. Contudo, 3 tumores com ADN aberrante originaram metástases diplóides; a existência de tumores metastáticos diplóides pode sugerir que estes apresentam alterações cromossômicas mas sem alteração da ploidia (Minke *et al.*, 1990; Rennstam *et al.*, 2001).

Estudos prévios na mama da gata e/ou da cadela (Rutteman *et al.*, 1988; Minke *et al.*, 1990; Pérez Alenza *et al.*, 1995; Misdorp, 2002) não obtiveram associação da ploidia de ADN com os parâmetros histológico, no entanto, Rutteman *et al.* (1988), utilizando citometria de fluxo, observou tendência à associação da aneuploidia e o potencial metastático. Na mulher vários estudos obtiveram associação da ploidia com o tamanho (Sidoni *et al.*, 2001; Michels *et al.*, 2003), o tipo histológico (Sidoni *et al.*, 2001), o grau nuclear (Minke *et al.*, 1990; Martinez-Arribas *et al.*, 2005), o grau histológico e o envolvimento ganglionar (Jaszcz-Gruchala *et al.*, 2001; Sidoni *et al.*, 2001; Martinez-Arribas *et al.*, 2005; Moureau-Zabotto *et al.*, 2005), o índice mitótico (Destexhe *et al.*, 1995; Sidoni *et al.*, 2001; Michels *et al.*, 2003) e a expressão de HER-2 (Martinez-Arribas *et al.*, 2005).

Em relação aos parâmetros imuno-histoquímicos avaliados apenas a expressão de caderina E se associou com a ploidia de ADN, com os carcinomas multiplóides a apresentarem a frequência mais baixa de fenótipo preservado.

A ploidia foi factor de prognóstico para a sobrevivência livre de doença e total na análise univariada, observando-se uma acentuada diminuição do tempo de sobrevivência nos carcinomas multiplóides de ADN. Também no grupo das gatas N₀ a aneuploidia se associou a piores tempos de sobrevivência total. Nos estudos realizados em animais apenas Mollermark *et al.* (1988) (citado por Destexhe *et al.*, 1995) encontrou associação entre a ploidia e a sobrevivência na mama da cadela. Na mulher vários estudos obtiveram associação com a sobrevivência total (Moureau-Zabotto *et al.*, 2005) e com a sobrevivência livre de doença (Sidoni *et al.*, 2001; Moureau-Zabotto *et al.*, 2005) e, a aneuploidia associa-se a mau prognóstico mesmo em pacientes com gânglios linfáticos negativos (N₀) (Moureau-Zabotto *et al.*, 2005).

Um outro parâmetro citométrico tem sido associado a mau prognóstico: a fracção de células verdadeiramente aneuplóides com conteúdo de ADN superior a 5c (5cER) (Auer *et al.*, 1980; Reles *et al.*, 1998; Lorenzato *et al.*, 2000; Sidoni *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2003). A presença de fracção 5cER alta (>1%) associou-se com o conteúdo de ADN aberrante, enquanto os carcinomas diplóides de ADN não evidenciavam fracção 5cER ou esta era baixa (<1%); estas associações traduziram-se em fracções altas em carcinomas metaplásicos e micropapilares e baixa em CEMs. A fracção 5cER associou-se de forma significativa não só a grau histológico

e nuclear altos, bem como com à invasão, a permeação vascular, a metastização ganglionar, índice mitótico alto e sobre-expressão de MMPs e VEGF. Este parâmetro foi prognóstico para a sobrevivência livre de doença na análise univariada mas não para a sobrevivência total, já que todos os carcinomas com fracção 5c evidenciavam baixo tempo de sobrevivência total.

A importância deste parâmetro citométrico foi ainda mais evidente no grupo de carcinomas diplóides: a presença de 5cER alto permitiu identificar um grupo de gatas que apesar de possuírem tumores associados a critérios histológicos de baixa agressividade biológica, apresentam com risco aumentado de morrer por carcinoma da mama. Estes resultados estão de acordo com o que tem vindo a ser descrito em estudos na mama da mulher: este parâmetro é um marcador fiável de instabilidade genética (Lorenzato *et al.*, 2000; Sidoni *et al.*, 2001).

Apesar das alterações significativas observadas na análise univariada, os parâmetros citométrico não foram factor de prognóstico independente, à semelhança de outros na mama da mulher (Sidoni *et al.*, 2001; Moureau-Zabotto *et al.*, 2005). Todavia, as associações obtidas na análise univariada, nomeadamente com o grau histológico, a permeação vascular e/ou a sobrevivência livre de doença e total, traduzem bem a importância destes parâmetros citométricos no estudo da oncobiologia dos carcinomas da mama da gata.

CONCLUSÕES

Da série analisada podemos concluir que os carcinomas são o tipo neoplásico mais frequente na mama da gata. Neste grupo lesional é importante referir que:

- Existem tipos histológicos de carcinomas com distintos graus de agressividade biológica, o que revela que é imperativo não só classificar estas lesões, como uma alteração da classificação adoptada. A classificação da OMS revelou-se inadequada e, apesar de a morfologia ser importante na caracterização dos carcinomas, a diferenciação celular revelou ser um critério mais útil para a sua avaliação. Assim, salientaram-se os CEMs como tumores de baixa agressividade biológica, associados a bons tempos de sobrevivência e, em oposição, os carcinomas metaplásicos e micropapilares, com mau prognóstico. O grupo de CDI-STE é heterogéneo, com comportamento biológico variável. Estes quatro tipos histológicos devem ser incluídos na classificação dos carcinomas da mama da gata.

- A graduação histológica revelou ser um indicador de prognóstico independente quer na totalidade da série, quer nas gatas com gânglios linfáticos negativos (N₀), devendo ser um critério a incluir, por rotina, nos relatórios histopatológicos. Não só é um bom critério para avaliar o prognóstico como evidencia boa correlação com os tipos histológicos.

- O exame histológico de rotina, permite por si só, separar os carcinomas da gata em grupos com prognóstico distinto; porém a técnica de imunohistoquímica revelou-se também útil, em particular na confirmação da natureza bifásica dos carcinomas epiteliais-mioepiteliais (CEMs).

- Os marcadores imuno-histoquímicos analisados permitiram agrupar os carcinomas da gata em grupos com bom e mau prognóstico. Em resumo, a expressão elevada de antigénio Ki-67, MMP1, MMP2, TMP1 e VEGF conferem aos carcinomas maior agressividade que se traduz em piores tempos de sobrevivência. A proteína Ki-67 parece-nos de particular utilidade na avaliação do prognóstico, devendo ser usada rotineiramente para determinar o perfil proliferativo dos carcinomas. Os restantes marcadores utilizados são também importantes para a compreensão da progressão e da metastização. Porém, pensamos que a sua utilização por rotina, só se justifica quando se aplicarem em Medicina Veterinária, terapias moleculares dirigidas contra estes factores.

Em relação ao HER-2/*neu*, são necessários novos estudos, quer por imunohistoquímica, quer genéticos por técnicas de CISH, FISH (fig. 111 e 112), ou Blot, para avaliar a importância deste receptor/gene na biologia do cancro de mama da gata; os

resultados deste estudo sugerem que as gatas com carcinomas positivos ao HER-2 apresentam pior prognóstico e podem beneficiar de terapias direcionadas contra este receptor, à semelhança do que já ocorre na mulher.

- A ploidia de ADN e a fracção 5cER fornecem informação adicional à histologia convencional para a avaliação do prognóstico; a fracção 5cER em particular permite identificar gatas que apesar de evidenciarem parâmetros histológicos de baixa agressividade biológica e ADN diplóide, apresentam risco acrescido de progressão da doença.

As alterações fibroquísticas não associadas a lesões mamárias apresentaram características semelhantes às alterações fibroquísticas presentes na periferia dos carcinomas; o aumento da expressão de MMPs, TIMP1 e VEGF sugere que estas alterações poderão estar em evolução no processo de cancerização, devendo ser vigiadas clinicamente.

Este estudo revela ainda a necessidade de os clínicos, sensibilizarem os proprietários, não só para não administrarem produtos hormonais para inibição do estro, bem como para a excisão precoce dos nódulos mamário. Na realidade, a maioria das lesões são extirpadas em estadios avançados, o que em muito contribui para o mau prognóstico classicamente conotado aos carcinomas. Demonstra ainda que a realização de estudos prospectivos é essencial para a pesquisa de factores de prognóstico, histológicos clássicos e novos marcadores biológicos, que permitam prever a evolução clínica dos carcinomas da gata.

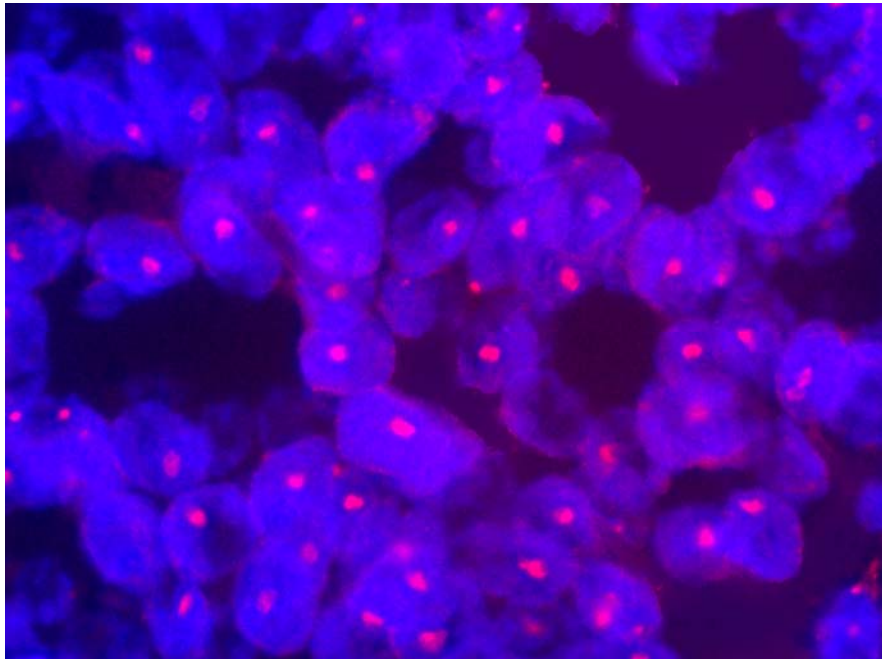


Fig. 111. Carcinoma de mama de gata evidenciando aumento do sinal do gene HER-2/*neu*. Técnica de FISH

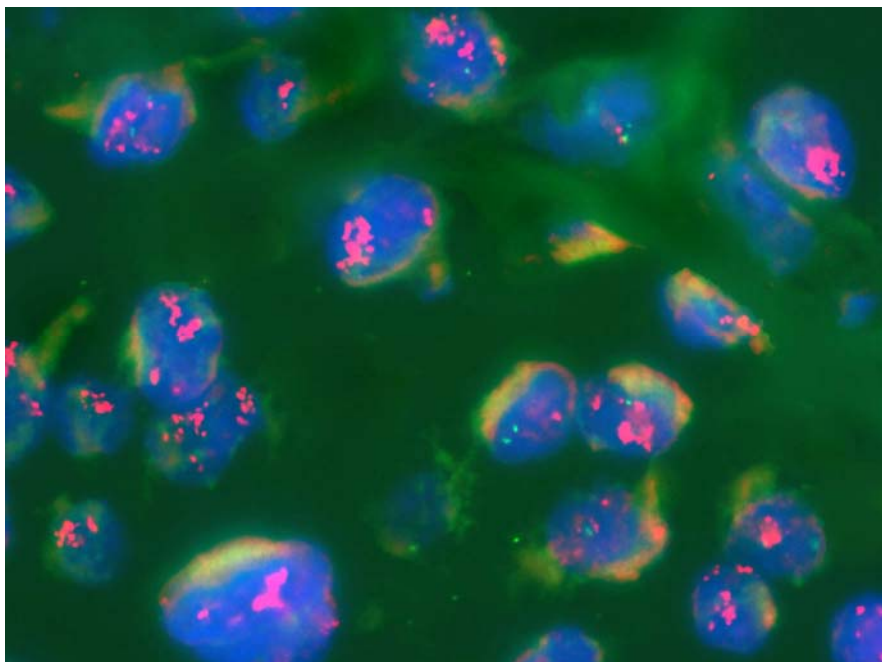


Fig. 112. Carcinoma de mama de mulher evidenciando amplificação de HER-2/*neu*. Técnica de FISH

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acs G, Lawton TJ, Rebbeck TR, LiVolsi VA, Zhang PJ. Differential expression of E-cadherin in lobular and ductal neoplasms of the breast and its biologic and diagnostic implications. *Am J Clin Pathol* 115:85-98, 2001.
- Adams J, Carder PJ, Downey S, Forbes MA, MacLennan K, Allgar V, Kaufman S, Hallam S, Bicknell R, Walker JJ, Cairnduff F, Selby PJ, Perren TJ, Lansdown M, Banks RE. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer: comparison of plasma, serum, and tissue VEGF and microvessel density and effects of Tamoxifen. *Cancer Res* 60:2898-2905, 2000.
- Adem C, Reynolds C, Adlakha H, Roche PC, Nascimento AG. Wide spectrum screening keratin as a marker of metaplastic spindle cell carcinoma of the breast: an immunohistochemical study of 24 patients. *Histopathology*, 40:556-562, 2002.
- Adriance MC, Inman JL, Petersen OW, Bissell MJ. Myoepithelial cells: good fences make good neighbors. *Breast Cancer Res* 7:190-197, 2005.
- Amin MB, Tamboli P, Merchant SH, Ordonez NG, Ro J, Ayala AG, Ro JY. Micropapillary component in lung adenocarcinoma: a distinctive histologic feature with possible prognostic significance. *Am J Surg Pathol* 26:358-364, 2002.
- Agnantis NK. Expression of p63, a marker of myoepithelial cells, in benign and malignant breast lesions. In Proceedings of XIV Porto Cancer Meeting, Porto, pp.25-26, 2005.
- Ahmed AA e Heller DS. Malignant adenomyoepithelioma of the breast with malignant proliferation of epithelial and myoepithelial elements. *Arch Pathol Lab Med* 124:632-636, 2000.
- Al-Nafussi, A.I., Hughes DE. In: Histological diagnosis of tumours by pattern analysis. Arnold, London, pp.127-167, 1997.
- Auer GU, Caspersson TO, Wallgren AS. ADN content and survival in mammary carcinoma. *Anal Quant Cytol* 2:161-165, 1980.
- Aydin O, Cinel L, Egilmez R, Ocal K, Ozer C. Adenomyoepithelioma of the breast. *Diagn Cytopathol* 25: 194-196, 2001.
- Azua-Romeo J, de Azua-Blanco J, Romeo P. Image cytometry in nonproliferative fibrocystic breast changes. Ploidy evaluation and epidemiologic study. *Anal Quant Cytol Histol* 23:129-134, 2001.
- Bámfalvi A, KraBort M, Vérgh A, Felszeghy E, Piffkó J. Dearranged expression of the E-cadherin/ β -catenin complex and the epidermal growth factor receptor in the clinical evolution and progression of oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 31:450-457, 2002.
- Barnes PJ, Boutilier R, Chiasson D, Rayson D. Metaplastic breast carcinoma: clinical-pathologic characteristics and HER2/neu expression. *Breast Cancer Res Treat* 91:173-178, 2005.
- Basset P, Okada A, Chenard M-P, Kannan R, Stoll I, Anglard P, Bellocq J-P, Rio M-C. Matrix metaloproteinases as a stromal effectors of human carcinoma progression: therapeutic implications. *Matrix Biology* 15:535-541, 1997.
- Behranwala KA, Nasiri N, Abdullah N, Trott PA, Gui GPH. Squamous cell carcinoma of the breast: clinico-pathologic implications and outcome. *EJSO* 29:386-389, 2003.
- Behrens J. Cadherins and catenins: role in signal transduction and tumor progression. *Cancer and Metastasis Reviews* 18: 15-30, 1999.
- Bellino R, Arisio, R, D'Addato F, Attini R, Durando A, Danese S, Bertone E, Grió R, Massobrio M. Metaplastic breast carcinoma: pathology and clinical outcome. *Anticancer Res* 23:669-673, 2003.

Benaud C, Dickson RB, Thompson EW. Roles of the matrix metalloproteinases in the mammary gland development and cancer. *Breast Cancer Res Treat* 50:97-116, 1998.

Benbow U, Schoenermank MP, Mitchell TI, Rutter JL, Shimokawa K, Nagase H, Brinckrthoff CE. A novel host/tumor cell interaction activates matrix metalloproteinase 1 and mediates invasion through type 1 collagen. *J Biol Chem* 274:25371-25378, 1999.

Berx G e Becker KF, Höfler H; Van Roy F. Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene. *Hum Mutation* 12:226-237, 1998.

Berx G e Van Roy F. The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. *Breast Cancer Res* 3:289-293, 2001.

Bierie B, Nozawa M, Renou JP, Shillingford JM, Morgan F, Oka T, Taketo MM, Cardiff RD, Miyoshi K, Wagner KU, Robinson GW, Hennighausen L. Activation of β -catenin in prostate epithelium induces hyperplasias and squamous transdifferentiation. *Oncogene* 22:3875-3887, 2003.

Bindels S, Mestdagt M, Vandewalle C, Jacobs N, Volders L, Noel A, Roy FV, Berx G, Foidart JM, Gilles C. Regulation of vimentin by SIP1 in human epithelial breast tumor cells. *Oncogene*, 2006.

Borg TK. It's the matrix. *Am J Pathol* 164:1141-1142, 2004.

Brasky SH. Myoepithelial mRNA expression profiling reveals a common tumor-suppressor phenotype. *Experimental Molec Pathol* 74:113-122, 2003.

Brenner RJ, Turner RR, Schiller V, Arndt RD, Giuliano A. Metaplastic carcinoma of the breast. *Cancer* 82:1082-1087, 1998.

Brown DC, Gatter KC. KI67 protein: the immaculate deception? *Histopathology* 49:2-11, 2002.

Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Guidi AJ, Dvorak HF, Senger DR, Connolly JL, Schnitt SJ. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelila growth factor) and its receptors in breast cancer. *Hum Pathol* 23:86-91, 1995.

Brown PD. Matrix metalloproteinase inhibitors. *Breast Cancer Res Treat* 52:125-136, 1998.

Brown PJ, Rema A, Gärtner F. Tyroglobulin, calcitonin, Ki 67 and CEA immunohistochemical staining of dog thyroid carcinomas. *Eur J Vet Pathol* 7:11-16, 2001.

Brunetti B, Sarli G, Preziosi R, Leprotti S, Benazzi C. E-cadherin expression in canine mammary carcinomas with regional lymph node metastases. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 50: 496-500, 2003.

Brunetti B, Sarli G, Preziosi R, Monari I, Benazzi C. E-cadherin and β -catenin reduction influence invasion but not proliferation and survival in canine malignant mammary tumors. *Vet Pathol* 42: 781-787, 2005.

Bukholm IK, Nesland JM, Kåresen R, Jacobsen U, Børresen-Dale A-L. E-cadherin and α -, β -, and γ -Catenin protein expression in relation to metastasis in human breast carcinoma. *J Pathol* 185:262-266, 1998.

Bult P, Verwiel JMM, Wobbes T, Kooy-Smits MM, Biert J, Holland R. Malignant adenomyoepithelioma of the breast with metastasis in the tyroid gland 12 years after excision of the primary tumor. *Virchows Arch* 436:158-166, 2000.

Cajulis RS, Haines III GK, Frias-Hidvegi D, McVary K, Bacus JW. Cytology, flow cytometry, image cytogenetics by fluorescence *in situ* hibridization in the diagnosis of transitional cell carcinoma in bladder washes: a comparative study. *Diagn Cytopathol* 13:214-224, 1995.

Campbell SE, Nasir L, Argyle DL, Bennet D. Molecular cloning and characterization of canine metallorproteinase-9 gene promoter. *Gene* 273:81-87, 2001.

Carico E, Atlante M, Bucci B, Nofroni I, Vecchione A. E-cadherin and α -catenin expression during tumor progression of cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 80:156-161, 2001.

- Castagnaro M, Casalone C, Ru G, Nervi GC, Bozzetta E, Caramelli M. Argyrophilic nucleolar organiser regions (AgNORs) count as indicator of post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. *Res Vet Science* 64:97-100, 1998a.
- Castagnaro M, De Maria R, Bozzetta E, Ru G, Casalone C, Biolatti B, Caramelli M. Ki-67 index as indicator of the post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. *Res Vet Science* 65: 223-226, 1998b.
- Catroppo JF, Lara JF. Metastatic metaplastic carcinoma of the breast: an uncharacteristic pattern of presentation with clinicopathologic correlation. *Diagn Cytopathol* 25:285-291, 2001.
- Chan AOO, Wong BCY, Lam HY, Loke SL, Chan WK, Hui WM, Yuen YH, Irene NG, Hou L, Wong WM, Yuen MF, Luk JMC, Lam SK. Deregulation of E-cadherin-catenin complex in precancerous lesions of gastric adenocarcinoma. *J Gastroenterology Hepatology* 18:534-539, 2003.
- Chang C e Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol* 11:S37-43, 2001.
- Chao TC, Wang CS, Chen SC, Chen MF. Metaplastic carcinomas of the breast. *J Surg Oncol* 71:220-225, 1999.
- Charpin C, Garcia S, Bouvier C, Devictor B, Andrac L, Choux R, Lavaut M. E-cadherin quantitative immunohistochemical assays in breast carcinomas. *J Pathol* 181:294-300, 1997.
- Chhieng DC, Tobbara SO, Marley EF, Talley LI, Frost AR. Microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in infiltrating lobular mammary carcinoma. *The Breast Journal* 9:200-207, 2003.
- Chung GG, Zerkowski MP, Ocal IT, Dolled-Filhart M, Kang JY, Psyrri A, Camp RL, Rimm DL. β -catenin and p53 analysis of a breast carcinoma tissue array. *Cancer* 15:2084-2092, 2004.
- Cohen C. Image cytometric analysis in pathology. *Hum Pathol* 27:482-493, 1996.
- Colella G, Giudice A, Adolfo A, De Simone S, Rossiello L, Rossiello R. Epithelial-myoepithelial carcinoma of the parotid gland. *Oral Oncology EXTRA* 40:29-32, 2004.
- Conacci-Sorrell ML, Zhurinsky J, Bem-Ze'ev A. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J Clin Invest* 109:987-991, 2002.
- Conti CJ. Vascular endothelial growth factor: regulation in the mouse skin carcinogenesis model and use in antiangiogenesis cancer therapy. *Oncologist* 7 (suppl 3):4-11, 2002.
- Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: Trials and tribulations. *Science* 295:2387-2392, 2002.
- Cowin P, Rowlands TM, Hatsell SJ. Cadherins and catenins in breast cancer. *Curr Opin Cell Biol* 17:499-508, 2005.
- Coyne JD, Dervan PA, Barr L. High grade carcinomas of the breast showing patterns of mixed ductal and myoepithelial differentiation (including myoepithelial cell-rich carcinoma of the breast). *Histopathology* 44:580-584, 2004.
- Dahlberg PS, Jacobson BA, Dahal G, Fink JM, Kratzke RA, Maddaus MA, Ferrin LJ. ERBB2 amplification in oesophageal adenocarcinoma. *Ann Thorac Surg* 78:1790-1800, 2004.
- Damiani S, Ludvikova M, Tomasic G, Bianchi S, Gown AM, Eusebi V. Myoepithelial cell and basal lamina in poorly differentiated in situ duct carcinoma of the breast. *Virchows Arch* 434:227-234, 1999.
- Darvin S e Dabrosin C. Tamoxifen inhibits secretion of vascular endothelial growth factor in breast cancer in vivo. *Cancer Res* 63:8742-8748, 2003.
- Dave G, Cosmatos H, Do T, Lodin K, Varshney D. Metaplastic carcinoma of the breast: a review. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 64:771-775, 2006.

Davidson B, Goldberg I, Kopolovic J, Lerner-Geva L, Gotlieb WH, Ben-Baruch G, Reich R. MMP-2 e TIMP-2 expression correlates with poor prognosis in cervical carcinoma – A clinicopathological study using immunohistochemistry and mRNA in situ hybridization. *Gynecol Oncol* 73:372-382, 1999.

Davidson B, Gotlieb WH, Ben-Baruch G, Nestland JM, Bryne M, Goldberg I, Kopolovic J, Berner A. E-Cadherin complex protein expression and survival in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 79:362-371, 2000.

Davis WG, Hennessy B, Babiera G, Hunt K, Valero V, Buchholz TA, Sneige N, Gilcrease MZ. Metaplastic sarcomatoid carcinoma of the breast with absent or minimal overt invasive carcinomatous component. *Am J Surg Pathol* 29:1456-1463, 2005.

De Jong JS, Van Diest PJ, Van Der Valk P, Baak JPA. Expression of growth factors growth-inhibiting factors, and their receptors in invasive breast cancer. II: correlations with proliferation and angiogenesis. *J Pathol* 184:53-57, 1998.

DeClerck YA, Mercurio AM, Stack MS, Chapman HA, Zutter MM, Muschel RJ, Raz A, Matrisian LM, Sloane BF, Noel A, Hendrix MJ, Coussens L, Padarathsingh M. Proteases, extracellular matrix, and cancer. *Am J Pathol* 164:1131-1139, 2004.

De Leeuw WJF, Berx G, Vos CBJ, Peterse JL, Van de Vijver MJ, Litvinov S, Van Roy F, Cornelisse CJ, Cleton-Jansen AM. Simultaneous loss of E-cadherin and cateninas in invasive lobular breast cancer and lobular carcinoma *in situ*. *J Pathol* 193:404-411, 1997.

De Maria R, Olivero M, Iussich S, Nakaichi M, Murata T, Biolatti B, Di Renzo MF. Spontaneous feline mammary carcinoma is a model of HER2 overexpressing poor prognosis human breast cancer. *Cancer Res* 65:907-912, 2005.

Destexhe E, Bicker E, Coignoul F. Image analysis evaluation of ploidy, S-phase fraction and nuclear area in canine mammary tumours. *J Comp Pathol* 113:205-216, 1995.

Dhouib RS, abbes I, Mrad K, Sassi S, Leila A, Driss M, Salah R, Romdhane KB. Micropapillary transitional cell carcinoma of the urinary bladder: report of two cases. *Pathologica* 97:338-340, 2005.

Dias Pereira P e Gärtner F. Expression of E-cadherin in normal, hyperplastic and neoplastic feline mammary tissue. *Vet Record* 163:297-302, 2003.

Dias Pereira P, Carvalheira J, Gärtner F. Cell proliferation in feline normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissue - an immunohistochemical study. *Vet J* 168:180-185, 2004.

Dincer Z, Jasani B, Haywood S, Mullins JE, Fuentalba IC. Metallothionein expression in canine and feline mammary and melanotic tumours. *J Comp Pathol* 125; 130-136, 2001.

Donadio AC, Durand S, Remedi MM, Frede S, Ceschin DG, Genti-Raimondi S, Chiabrando GA. Evaluation of stromal metalloproteinases and vascular endothelial growth factors in a spontaneous metastasis model. *Exper Mol Pathol*, 79:259-264, 2005.

Dontu G, El-Ashry D, Wicha MS. Breast cancer, stem/progenitor cells and the estrogen receptor. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 15:193-197, 2004.

Douglas-Jones A, Shah V, Morgan J, Dallimore N, Rashid M. Observer variability in the histopathological reporting of core biopsies of breast lesions is reduced by the use of immunohistochemistry for CK5/6, calponin and p63. *Histopathology*, 47:202-208, 2005.

Duigou F, Herlin P, Marnay J, Michels JJ. Variation of flow cytometric DNA measurement in 1,485 primary breast carcinomas according to Guidelines for DNA histogram interpretation. *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)* 42:35-42, 2000.

Dunne B, Lee AHS, Pinder SE, Bell JA, Ellis IO. An immunohistochemical study of metaplastic spindle cell carcinoma, phyllodes tumor and fibromatosis of the breast. *Hum Pathol* 34:1009-1015, 2003.

Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potent target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol* 20:4368-4380, 2002.

- Edwards PC, Bhuiya T, Kelsch RD. Assessment of p63 expression in the salivary gland neoplasms adenoid cystic carcinoma, polymorphous low-grade adenocarcinoma, and basal cell and canalicular adenomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 97:613-619, 2004.
- Elangbam CS, Qualls CW, Dahlgren RR. Cell adhesion molecules - update. *Vet Pathol* 34:61-73, 1997.
- El-Bahrawy M, el-Masry N, Alison M, Poulsom R, Fallowfield M. Expression of β -catenin in basal cell carcinoma. *Br J Dermatol* 148:964-970, 2003.
- Ellis IO, Schnitt SJ, Sastre-Garau X, Bussolati G, Tavassoli FA, Eusebi V, Peterse JL, Mukai K, Tabár L, Jacquemier J. Invasive breast carcinoma. In: Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. F A Tavassoli e P Deville (Eds). World Health Organization Classification of tumours. IARC Press, Lyon, France, pp. 13-59, 2003.
- Elston CW, Ellis IO. Assessment of histological grade. In: Systemic pathology - the breast, CW Elston, IO Ellis (Eds), 3rd ed, vol 13, Churchill and Livingstone, London, pp. 365-384, 1998.
- Espinosa de los Monteros A, Millán MY, Carrasco JOL, Reymundo C, Martín de las Mulas J. Immunolocalization of the smooth muscle-specific protein Calponin in complex and mixed tumors of the mammary gland of the dog: assessment of the morphogenetic role of the myoepithelium. *Vet Pathol* 39:247-256, 2002.
- Faleiro Rodrigues C, Lopes CS. E-cadherin, CD44 and CD44v6 in squamous intraepithelial lesions and invasive carcinomas of the uterine cervix: an immunohistochemical study. *Pathobiol* 71:329-336, 2004.
- Faleiro Rodrigues C, Macedo-Pinto I, Pereira D, Ferreira VM, Lopes CS. Association of E-cadherin and β -catenin immunorexpression with clinicopathologic features in primary ovarian carcinoma. *Hum Pathol* 35:663-669, 2004.
- Faleiro Rodrigues C. The E-cadherin–catenin complex in ovarian epithelial tumours. Tese de doutoramento, Faculdade de Medicina-Universidade do Porto, 2005.
- Fata JE, Werb Z, Bissel MJ. Regulation of mammary gland branching morphogenesis by the extracellular matrix and its remodeling anzymes. *Breast Cancer Res* 6:1-11, 2004.
- Fernández-Aguilar S, Simon P, Buxant F, Simonart T, Noël JC. Tubular carcinoma of thre breast and associated intra-epithelial lesions; a comparative study with invasive low-grade ductal carcinomas. *Virchows Arch* 447:683-687, 2005.
- Ferrara N e Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Rev* 18:4-25, 1997.
- Ferrara N. Role of the vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:1433-1446, 2001.
- Flint AF, U'Ren L, Legare ME, Withrow SJ, Dernell W, Hanneman WH. Overexpression of the erbB-2 proto-oncogene in canine osteosarcoma cell lines and tumors. *Vet Pathol* 41:291-296, 2004.
- Foekens JA, Peters HA, Grebenchtchikov N, Look MP, Meijer-van Gelder ME; Geurts-Moespot A, van der Kwast TH, Sweep CGJ, Klijn GM. High tumor levels of vascular endothelial growth factor predict poor response to systemic therapy in advanced breast cancer. *Cancer Res* 61:5407-5414, 2001.
- Foschini MP e Eusebi V. Carcinomas of the breast showing myoepithelial differentiation - A review of the literature. *Virchows Arch* 432:303-310, 1998.
- Foschini MP, Pizzicanella G, Peterse JL, Eusebi V. Adenomyoepithelioma of the breast associated with low-grade adenosquamous and sarcomatoid carcinomas. *Virchows Arch* 427:243-250, 1995.
- Foschini MP, Reis-Filho JS, Eusebi V, Lakhani SR. Salivary gland-like tumours of the breast: surgical and molecular pathology. *J Clin Pathol* 56:497-506, 2003.

Fox SB, Leek RD, Weekes M, Whitehouse RM, Gatter KC, Harris AL. Quantitation and prognostic value of breast cancer angiogenesis: comparison of microvessel density, Charkley count, and computer image analysis. *J Pathol* 177:275-283, 1995 breast cancer.

Fox SB, Gatter KC, Harris AL. Tumor angiogenesis. *J Pathol* 179:232-237, 1996.

Fox SB, Leek RD, Bliss J, Mansi JL, Gusterson B, Gatter KC, Harris AL. Association of tumor angiogenesis with bone marrow micrometastases in breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 89:1044-1049, 1997.

Franchi A, Gallo O, Boddi V, Santucci M. Prediction of occult neck metastases in laryngeal carcinoma: role of proliferation cell nuclear antigen, MIB-1, and E-cadherin immunohistochemical determination. *Clin Cancer Res* 2:1801-1808, 1996.

Fuchs M, Hermannstädter C, Specht K, Knyazev P, Ullrich A, Rosivatz E, Busch R, Hutzler P, Hfler H, Lubert B. Effect of tumor-associated mutant E-cadherin variants with defects in exons 8 or 9 on matrix metalloproteinase 3. *J Cell Phys* 202:805-813, 2005.

Gama A, Alves A, Gärtner F, Schmitt F. P63: a novel myoepithelial cell marker in canine mammary tissues. *Vet Pathol* 40:412-420, 2003.

Gamallo C, Palacios J, Suarez A, Pizarro A, Navarro P, Quintanilha M, Canoa. Correlation of E-cadherin expression with differentiation grade and histological type in breast carcinoma. *Am J Pathol* 142:987-993, 1993.

Gärtner F, Geraldles M, Cassali G, Rema A, Schmitt F. DNA measurement and immunohistochemical characterization of epithelial and mesenchymal cells in canine mixed mammary tumours: putative evidence for a common histogenesis. *Vet J* 158:39-47, 1999.

Garbett EA, Reed MWR, Stephenson TJ, Brown NJ. Proteolysis in human breast cancer. *J Clin Pathol Mol Pathol* 53:99-106, 2000.

Gasparini G, Toi M, Gion M, Verderio P, Dittadi R, Hanatani M, Matsubara I, Vinante O, Bonoldi E, Boracchi P, Gatti C, Suzuki H, Tominaga T. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein in node-negative breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 89:139-147, 1997.

Gasparini G. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *The Oncologist* 5 (Suppl 1):37-44, 2000.

Geraldles M, Gärtner F, Schmitt F. Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours. *Vet Record* 146:403-406, 2000.

Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31:13-20, 1983.

Giannelli G, Falk-Marzillier J, Schiraldi O, Stetler-Stevenson WG, Quaranta V. Induction of cell migration by matrix metalloproteinase-2 cleavage of laminin-5. *Science* 277:225-228, 1997.

Gilles C, Polette M, Piette J, Delvigne A-C, Thompson EW, Foidart JM, Birembaut P. Vimentin expression in cervical carcinomas: association with invasive and migratory potential. *J Pathol* 180:175-180, 1996.

Goldstein NS, Bassi D, Watts JC, Layfield LL, Yaziji H, Gown AM. E-cadherin reactivity in 95 noninvasive ductal and lobular lesions of the breast. *Am J Clin Pathol* 115:534-542, 2001.

Green KA e Lund LR. ECM degrading proteases and tissue remodelling in the mammary gland. *BioEssays* 27:894-903, 2005.

Grenko RT, Abendroth CS, Davis AT, Levin RJ, Dardick I. Hybrid tumors or salivary gland tumors sharing common differentiation pathways? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 86:188-195, 1998.

- Griew F, Li WQ, Iacopetta B. Genetic polymorphisms in the MMP-2 and MMP-9 genes and breast cancer phenotype. *Breast Cancer Res Treat* 88:197-204, 2004.
- Günhan-Bilgen I, Zekioglu O, Üstün EE, Memis A, Erhan Y. Invasive micropapillary carcinoma of the breast: clinical, mammographic, and sonographic findings with histopathologic correlation. *Am J Roentgenol*. 179(4):927-31, 2002.
- Guidi AJ, Berry DA, Broadwater G, Perloff M, Norton L, Barcos MP, Hayes DF. Association of angiogenesis in lymph node metastases with outcome of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 92:486-492, 2000.
- Guinebretiere JM, Menet E, Tardivon A, Cherel P, Vanel D. Normal and pathological breast, the histological basis. *Eur J Radiol*. 54:6-14, 2005.
- Gunningham SP, Currie MJ, Han C, Robinson BA, Scout PAE, Harris AL, Fox SB. The short form of the alternatively spliced flt-4 but not its ligand vascular endothelial growth factor C is related to lymph node metastasis in Human breast cancer. *Clin Cancer Res* 6:4278-4286, 2000.
- Gupta A, Deshpande CG, Badve S. Role of E-cadherins in development of lymphatic tumor emboli. *Cancer* 97:2341-2347, 2003.
- Gusterson BA, Ross ST, Heath VJ, Stein T. Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. *Breast Cancer Res* 7:143-148, 2005.
- Hajra KM e Fearon ER. Cadherin and catenin alterations in human cancer. *Genes, Chromosomes & Cancer* 34:255-268, 2002.
- Han AC, Peralta Soler A, Knudsen KA, Salazar H. Distinct cadherin profiles in special variant carcinoma and other tumors of the breast. *Hum Pathol* 30:1035-1039, 1999.
- Harigopal M, Shin SJ, Murray MP, Tickoo SK, Brogi E, Rosen PP. Aberrant E-cadherin staining patterns in invasive mammary carcinoma. *World J Surg Oncol* 3:73, 2005.
- Heimann R, Lan F, McBride R, Hellman S. Separating favourable from unfavourable prognostic markers in breast cancer: the role of E-cadherin. *Cancer Res* 60:298-304, 2000.
- Hellmén E, Lindgren A. The expression of intermediate filaments in canine mammary glands and their tumors. *Vet Pathol* 26:420-428, 1989.
- Hellmén E, Bergström R, Holmberg L, Spångberg IB, Hansson K, Lindgren A. Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. *Vet Pathol* 30:20-27, 1993.
- Hill CB, Yeh IT. Myoepithelial cell staining patterns of papillary breast lesions: from intraductal papillomas to invasive papillary carcinomas. *Am J clin Pathol* 123:36-44, 2005.
- Holmang S, Thomsen J, Johansson SL. Micropapillary carcinoma of the renal pelvis and ureter. *J Urol* 175:463-466, 2006.
- Holzworth J. Tumors and tumor-like lesions. In: Diseases of the cat: Medicine & Surgery, vol 1, WB Saunders Co, Philadelphia, pp: 527, 537, 1987.
- Howe LR e Brown AMC. Wnt signalling and breast cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 3:36-41, 2004.
- Hidalgo M e Eckhardt SG. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* 93:178-193, 2001.
- Hirayama K, Yokota H, Onai R, Kobayashi T, Kumata T, Kihara K, Okamoto M, Sako T, Nakade T, Izumisawa Y, Taniyama H. Detection of matrix metalloproteinase in canine mammary tumours: analysis by Immunohistochemistry and zymography. *J Comp Pathol* 127:249-256, 2002.

- Ivanyi D, Minke JMH, Hageman C, Groeneveld E, van Doornewaard G. Patterns of expression of feline cytokeratins in healthy epithelia and mammary carcinoma cells. *Am J Vet Res* 53:304-314, 1993.
- Jaszczyk-Gruchala A, Swiatkiewicz I, Lackowska B, Gruchala A, Niezabitowski A. Comparative analysis of DNA content estimated by flow and image cytometry in breast tumor samples. *Pol J Pathol* 52:15-19, 2001.
- Jia Y, Zeng Z-Z, Markwart SM, Rockwood KF, Ignatoski KMW, Ethier SP, Livant DL. Integrin fibronectin receptors in metalloproteinase-1-dependent invasion in breast cancer and mammary epithelial cells. *Cancer Res* 64:8674-8681, 2004.
- Jensen EV, Cheng G, Palmieri C, Saji S, Makela S, Van Noorden S, Wahlstrom T, Warner M, Coombes RC, Gustafsson J-A. Estrogen receptors and proliferation markers in primary and recurrent breast cancer. *Proc Natl Acad Sci* 18:15197-15202, 2001.
- Jeffers MD, Paxton J, Bolger B, Richmond JA, Kennedy JH, McNicol AM. E-Cadherin and integrin cell adhesion molecule expression in invasive and in situ carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 64:481-486, 1997.
- Johansson N, Ahonen M, Kähäri V-M. Matrix metalloproteinases in tumor invasion. *Cell Mod Life Sci* 15:5-15, 2000.
- Johnsen M, Lund LR, Rømer J, Almholt K, Danø K. Cancer invasion and tissue remodelling: common themes in proteolytic matrix degradation. *Curr Opin Cell Biol* 10:667-671, 1998.
- Jones C, Foschini MP, Chaggar R, Lu Y-J, Wells D, Shipley JM, Eusebi E, Lakhani SR. Comparative genomic hybridization analysis of myoepithelial carcinoma of the breast. *Lab Investigation* 80:831-836, 2000.
- Jones C, Tooze R, Lakhani SR. Malignant adenomyoepithelioma of the breast metastasizing to the liver. *Virchows Arch* 442:504-506, 2003.
- Jones C, Ford E, Gillett C, Ryder K, Merrett S, Reis-filho JS, Fulford LG, Hanby A, Lakhani SR. Molecular cytogenetic identification of subgroups of grade III invasive ductal breast carcinomas with different clinical outcomes. *Clin Cancer Res* 10:5988-5997, 2004.
- Jones JL e Walker RA. Control of matrix metalloproteinase activity in cancer. *J Pathol* 183:377-379, 1997.
- Jones JL, Glynn P, Walker RA. Expression of MMP-2 and MMP-9, their inhibitors, and the activator MT1-MMP in primary breast carcinomas. *J Pathol* 189:161-168, 1999.
- Jones JL, Shaw JA, Pringle JH, Walker RA. Primary breast myoepithelial cells exert an invasion-suppressor effect on breast cancer cells via paracrine down-regulation of MMP expression in fibroblasts and tumour cells. *J Pathol* 201:562-572, 2003.
- Jones TC, Hunt RD, King NW. In: Veterinary Pathology, 6th ed, Williams & Wilkins, Philadelphia, pp: 1191-1200, 1997.
- Kalirai H, Clarke RB. Human breast epithelial stem cells and their regulation. *J Pathol* - article in press, 2006.
- Kallakury BVS, Karikhalli S, Haholu A, Sheehan CE, Azumi N, Ross JS. Increased expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 correlate with poor prognostic in renal carcinoma. *Clin Cancer Res* 7:3113-3129, 2001.
- Kawai H, Li H, Chun P, Avraham S, Avraham HK. Direct interaction between BRCA1 and estrogen receptor regulates vascular endothelial growth factor (VEGF) transcription and secretion in breast cancer cells. *Oncogene* 21:7730-7739, 2002.
- Keshgegian AA e Cnaan A. Proliferation markers in breast carcinoma: mitotic count, S-phase fraction, proliferation cell nuclear antibody and MIB-1. *Am J Clin Pathol* 104:42-29, 1995.
- Kesse-Adu R, Shousha S. Myoepithelial markers are expressed in at least 29% of oestrogen receptor negative invasive breast carcinoma. *Modern Pathol* 17:646-652, 2004.

- Khan HN, Wylds L, Dunne B, Lee AHS, Pinder SE, Evans AJ, Robertson JFR. Spindle cell carcinoma of the breast: a case series of a rare histological type. *Eur J Surg Oncol* 29:600-603, 2003.
- Kihara M, Yokomise H, Irie A, Kobayashi S, Kushida Y; Yamauchi A. Malignant adenomyoepithelioma of the breast with lung metastases: report of a case. *Surg Today* 31:899-903, 2001.
- Kim M-J, Gong G, Joo HJ, Ahn S-H, Ro JY. Immunohistochemical and clinicopathologic characteristics of invasive ductal carcinoma of breast with micropapillary carcinoma component. *Arc Pathol Lab Med* 129:1277-1282, 2005.
- Kleer CG, van Golen KL, Braun T, Merajver SD. Persistent E-cadherin expression in inflammatory breast cancer. *Mod Pathol* 14:458-464, 2001.
- Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol* 43(Suppl):S42-S51, 1999.
- Kochhar R, Howard EM, Umbreit JN; Lau SK. Metaplastic breast carcinoma with squamous differentiation molecular and clinical analysis of six cases. *The Breast Journal* 11:367-369, 2005.
- Konecny GE, Meng YG, Untch M, Wang H-J, Bauerfind I, Epstein M, Stieber P, Vernes J-M, Gutierrez J, Hong K, Beryt M, Hepp H, Slamon DJ, Pegram MD. Association between HER-2/neu and vascular endothelial growth factor expression predicts clinical outcome in primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 10:1706-1716, 2004.
- Korsching E, Packeisen J, Liedtke C, Hungermann D, Wlfing P, van Diest PJ, Brandt B, Boecker W, Buerger H. The origin of vimentin expression in invasive breast cancer: epithelial-mesenchymal transition, myoepithelial histogenesis or histogenesis from progenitor cells with bilinear differentiation potential? *J Pathol* 206:451-457, 2005.
- Kowalshi PJ, Rubin MA, Kleer CG. E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases. *Breast Cancer Res* 5:R217-R222, 2003.
- Kuroda H, Sakamoto G, Ohnisi K, Itoyama S. Clinical and pathologic features of invasive micropapillary carcinoma. *Breast Cancer* 11:169-174, 2004a.
- Kuroda H, Sakamoto G, Ohnisi K, Itoyama S. Overexpression of Her2/neu, estrogen and progesterone receptors in invasive micropapillary carcinoma of the breast. *Breast Cancer* 11:301-306, 2004b.
- Kuroda N, Hamaguchi N, Toi M; Yamaoka K, Miyazaki E, Hiroi M, Nakata H, Taguchi H, Enzan H. Pulmonary adenocarcinoma with micropapillary component: an immunohistochemical study. Case report. *APMIS* 113:550-554, 2005a.
- Kuroda H, Sugimoto T, Takahashi T, Moriki T, Toi M, Miyazaki E, Hiroi M, Enzan H. Invasive micropapillary carcinoma of the breast: an immunohistochemical study of neoplastic and stromal cells. *Int J Surg Pathol* 13:51-55, 2005b.
- Kuroda N, Hamaguchi N, Takeuchi E, Ohara M; Hirouchi T, Mizuno K. Lung adenocarcinoma with a micropapillary pattern: a clinicopathological study of 25 cases. *APMIS* 114:381-385, 2006.
- Kurahara S, Shinohara M, Ikebe T, Nakamura S, Beppu M, Hiraki A, Takeushi H, Shirasuma K. Expression of MMP2, MT-MMP, and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis. *Head & Neck* 21:627-638, 1999.
- Kurian KM e Al-Nafussi A. Sarcomatoid/metaplastic carcinoma of the breast: a clinicopathological study of 12 cases. *Histopathology* 40:58-64, 2002.
- Kuru B, Camlibel M, Gulcelik MA, Alagol H. Prognostic factors affecting survival and disease-free survival in lymph node-negative breast carcinomas. *J Surg Oncol* 83:167-172, 2003.
- Lakhani SR, O'Hare MJ. The mammary myoepithelial cell – Cinderella or ugly sister. *Breast Cancer Res* 3:1-4, 2001.

- Lampugnani MG, Zanetti A, Corada M, Takahashi T, Balconi G, Brevario F, Orsenigo F, Cattelino A, Kemler R, Daniel TO, Dejana E. Contact inhibiting of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin, β -catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148. *J Cell Biol* 161:793-804, 2003.
- Lear-Kaul KC, Yoon HR, Kleinschmidt-DeMasters BK, McGavran L, Singh M. HER-2/neu status in breast cancer metastases to the central nervous system. *Arch Pathol Lab Med* 127:1451-1457, 2003.
- Lee JS, Kim YB, Jung JJ, Min KB, Lee MC, Park CS. Expression of Vascular endothelial growth factor in invasive ductal carcinoma of the breast and the relation to angiogenesis and p53 and HER-2/neu protein expression. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 10:289-295, 2002.
- Lee JS, Kim YB, Min KW. Metaplastic mammary carcinoma with osteoclast-like giant cells: identical point mutation of p53 gene only identified in both the intraductal and sarcomatous components. *Virchows Arch* 444:194-197, 2004.
- Leek RD, Hunt NC, Landers RJ, Lewis CE, Royds JA, Harris AL. Macrophage infiltration is associated with VEGF and EGFR expression in breast cancer. *J Pathol* 190:530-436, 2000.
- Leibl S, Gogg-Kammerer M, Sommersacher A, Denk H, Moinfar F. Metaplastic breast carcinomas: are they of myoepithelial differentiation? *Am J Surg Pathol* 29:347-353, 2005.
- Leonardi E, Girlando S, Serio G, Mauri FA, Perrone G, Scampini S, Dalla Palma P. PCNA and Ki67 expression in breast carcinoma: correlations with clinical and biological variables. *J Clin Pathol* 45:416-419, 1992.
- Leppä S, Saarto T, Vehmanen L, Blomqvist C, Elomaa I. A high serum matrix metalloproteinase-2 level is associated with an adverse prognosis in node-positive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 10:1057-1063, 2004.
- Lester SC, Cotran RS. In: The Breast. Robbins Pathologic Basis of Disease. RS Cotran, V Kumar, T Collins (Eds), 6th ed, W B Saunders Co, Philadelphia, pp: 1102-1117, 1999.
- Lewis JS, Landers RJ, Underwood JCE, Harris AL, Lewis CE. Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas. *J Pathol* 192:150-158, 2000.
- Lincoln II DW, Phillips PG, Bove K. Estrogen-induced Ets-1 promotes capillary formation in an *in vitro* tumor angiogenesis model. *Breast Cancer Res Treat* 78:167-178, 2003.
- Linderholm B, Tavelin B, Grankvist K, Henriksson R. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is of high prognostic value in lymph-node negative breast cancer. *J Clin Oncol* 16:3121-3128, 1998.
- Linderholm B, Grankvist K, Wilking N, Johansson M, Tavelin B, Henriksson R. Correlation of Vascular endothelial growth factor content with recurrences, survival, and first relapse site in primary node-positive breast carcinoma after adjuvant treatment. *J Clin Oncol* 18:1423-1431, 2000.
- Liu S, Edgerton SM, Moore DH, Thor AD. Measures of cell turnover (proliferation and apoptosis) and their association with survival in breast cancer. *Clin Cancer Res* 7:1716-1723, 2001.
- Liu X-W, Taube ME, Jung K-K, Dong Z, Lee YL, Roshy S, Sloane BF, Fridman R, Choi Kim H-R. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protects human breast epithelial cells from extrinsic cell death: a potential oncogenic activity of tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *Cancer Res* 65:898-905, 2005.
- Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova M, Olopade OI, Moore DT, Perou CM. Phenotype evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol* 19:264-271, 2006.
- Loo WTY, Cheung MNB, Chow LWC. Production of matrix metalloproteinases in specific subpopulations of human-patient breast cancer invading in three dimensional culture system. *Life Sciences* 76:743-752, 2004.

- Lorenzato M, Abboud P, Masure M, Bouttens D, Visseaux-Coletto B, Quereux C, Adnet JJ. Image Cytometry detection of breast cancer cells with >5c DNA content and minor DNA stemlines. *Anal Quant Cytol Histol* 22:199-205, 2000.
- Loretto AP, Ilha MRS, Ordás J, Martín de las Mulas J. Clinical, pathological and immunohistochemical study of feline mammary fibroepithelial hyperplasia following a single injection of depot medroxyprogesterone acetate. *J Feline Medicine Surgery* 7:43-52, 2005.
- Loukopoulos P, Mungall BA, Straw RC, Thorntont JR, Robinson WF. Matrix metalloproteinase-2 and -9 involvement in canine tumors. *Vet Pathol* 43:382-394, 2003.
- Loureiro RMB, Maharaj ASR, Dankort D, Muller WJ, D'Amore PA. ErbB2 overexpression in mammary cells upregulates VEGF through the core promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 326:455-465, 2005.
- Luna-More S, Gonzalez B, Acedo C, Rodrigo I, Luna C. Invasive micropapillary carcinoma of the breast. A new special type of invasive mammary carcinoma. *Pathology Research and Practice* 190:668-674, 1994.
- Määttä M, Soini Y, Liakka A, Autio-Harmainen H. Differential expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, and membrane type1-MMP in hepatocellular and pancreatic adenocarcinoma: implications for tumor progression and clinical prognosis. *Clin Cancer Res* 6:2726-2734, 2000.
- MacDougall LD. Mammary fibroadenomatous hyperplasia in a young cat attributed to treatment with megestrol acetate. *Can Vet J* 44:227-229, 2003.
- Madewell BR, Theilen GH. In: Tumors of the mammary gland. Veterinary Cancer Medicine, GH Theilen e BR Madewell (Eds), 2th ed, Lea & Febiger, Philadelphia, pp: 327-340, 1987.
- Maeda K, Kang SM, Onoda M, Ogawa M, Sawada T, Nakata B, Kato Y, Chung YS, Sowa M. Expression of p53 and vascular endothelial growth factor associated with tumor angiogenesis and prognosis in gastric cancer. *Oncology* 55:594-599, 1998.
- Mantesso A, Loduca SVL, Jaeger RG, Decio SPJ. Analysis of epithelial-myoepithelial carcinoma based on the establishment of a novel cell line. *Oral Oncology* 39:453-458, 2003.
- Martín de las Mulas JM, van Neil M, Millán Y, Blankenstein MA, van Mil F, Misdorp W. Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in feline mammary gland benign and malignant lesions: comparison with biochemical assay. *Domestic Animal Endocrinology* 18:111-125, 2000a.
- Martín de las Mulas JM, Millán Y, Bautista MJ, Pérez J, Carrasco L. Estrogen and Progesterone receptors in feline fibroadenomatous change: an immunohistochemical study. *Res Vet Science* 68:15-21, 2000b.
- Martín de las Mulas J, Ordás J, Millán Y, Fernández-Soria V, Ramon y Cajal S. Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 80:363-367, 2003.
- Martinez-Arribas F, Nunez-Villar MJ, Lucas AR, Sanchez J, Tejerina A, Schneider J. The S-phase fraction of the aneuploid subpopulation is the biologically relevant one in aneuploid breast cancers. *Breast Cancer Res Treat* 92:77-80, 2005.
- Matos I, Dufloth R, Alvarenga M, Zeferino LC, Schmitt F. p63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecules markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. *Virchows Arch* 447:688-694, 2005.
- Matos AJF, Lopes C, Carvalheira J, Santos M, Rutteman GR, Grtner F. E-cadherin expression in canine malignant mammary tumours: relationship to other clinico-pathological variables. *J Comp Pathol* 134:182-189, 2006.
- Marques FR, Fonsechi-Carvasan GA, De Angelo Andrade LAL, Böttcher-Luiz F. Immunohistochemical patterns for α - and β -catenin, E- and N-cadherin expression in ovarian epithelial tumors. *Gynecol Oncol* 94:16-24, 2004.
- Maru D, Middleton LP, Wang S, Valero V, Sahin A. HER-2/neu and p53 overexpression as biomarkers of breast carcinoma in women age 30 years and younger. *Cancer* 103:900-905, 2005.

McEntee MF e Brenneman KA. Dysregulation of β -catenin is common in canine sporadic colorectal tumors. *Vet Pathol*, 26:226-236, 1999.

McMahon G. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *The Oncologist* 5 suppl 1:3-10, 2000.

Medi M, Sevelde P, Czerwenka K, Dobianer K, Hanak H, Hruza C, Klein M, Leodolter S, Mullauer-Ertl S, Rosen A, Salzer H, Vava N, Spona J. ADN amplification of HER-2/*neu* and INT-2 oncogenes in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 59:321-326, 1995.

Ménard S, Tagliabue E, Campiglio M, Pupa SM. Role of HER2 gene overexpression in breast carcinoma. *J Cell Physiol* 182:150-162, 2000.

Michels JJ, Marnay J, Delozier T, Denoux Y, Chasle J. Proliferative activity in primary breast carcinomas is a salient prognostic factor. *Cancer* 100:455-464, 2003.

Millanta F, Lazzeri G, Mazzei M, Vannozzi I, Poli A. MIB-1 labelling index in feline dysplastic and neoplastic mammary lesions and its relationship with postsurgical prognosis. *Vet Pathol* 39:120-126, 2002a.

Millanta F, Lazzeri G, Vannozzi I, Piacava P, Poli A. Correlation of vascular endothelial growth factor expression to overall survival in feline mammary carcinomas. *Vet Pathol* 39:690-696, 2002b.

Millanta F, Calandrella M, Bari G, Vannozzi I, Poli A. Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline tissues. *Res Vet Science* 79:225-232, 2005.

Millanta F, Silvestri G, Vaselli C, Citi S, Pisani G, Lorenzi D, Poli A. the role of vascular endothelial growth factor and its receptor Flk-1/KDR in promoting tumour angiogenesis in feline and canine mammary carcinomas: a preliminary study of autocrine and paracrine loops. *Res Vet Science* - no prelo, 2006.

Minke JM, Cornelisse CJ, Stolwijk JAM, Kuipers-Dijksoorn NJ, Rutteman GR, Misdorp W. Flow cytometric DNA ploidy analysis of feline mammary tumors. *Cancer Res* 50:4003-4007, 1990.

Misdorp W. Tumors of the mammary gland. In: Tumors in domestic animals, 4th ed, DJ Meuten (Ed), Iowa State Press, Iowa, USA. pp575-606, 2002.

Misdorp W, Else RW, Hellmén E, Lipscomb TP. Histological classification of mammary tumors of the dog and cat. Histological classification of tumors of the Alimentary system of domestic animals. 2^a Ed, vol X, World Health Organization and Armed forces Institute of Pathology, Washington DC, 63-64; 68, 1999.

Misdorp W, Romijn A, Hart AA. Feline mammary tumors: a case-control study of hormonal factors. *Anticancer Res* 11:1793-1797, 1991.

Misdorp W, Weijer K. Animal model of human disease: breast cancer. *Am J Pathol* 98:573-576, 1980.

Miyata Y, Kanda S, Nomata K, Hayashida Y, Kanetake H. Expression of metalloproteinase-2, metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in transitional cell carcinoma of upper urinary tract: correlation with tumor stage and survival. *Urology* 63:602-608, 2004.

Miyoshi K e Hennighausen L. β -catenin: a transforming actor on many stages. *Br Cancer Res* 5:63-68, 2003.

Morrison WB. Canine and feline mammary tumours. In Cancer in dogs and cats, Lippincott Williams & Wilkinson, Philadelphia, pp.591-597, 1998.

Moses MA. A regulation of neovascularization by matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Stem Cells* 15:180-189, 1997.

Moulthou JE. Tumors of the mammary gland. Tumors in domestic animals. Moulthou JE (Ed), University of California Press, 3^a ed, pp:518-549, 1990.

Moureaux-Zabboto L, Bouchet C, Cesari D, Uzan S, Lefranc JP, Antoine M, Genestie C, Deniaud-Alexandre E, Bernaudin JF, Touboul E, Fleury-Feith J. Combined flow cytometry determination of S-phase fraction and DNA ploidy is an independent prognostic factor in node-negative invasive breast carcinoma:

- review of a series of 271 patients with stage I and stage II breast cancer. *Cancer/Radiothérapie* 9:575-586, 2005.
- Murray G, Duncan ME, O'Neill P, McKay JA, Melvin WT, Fothergill JE. Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in oesophageal cancer. *J Pathol* 185:256-261, 1998.
- Myoshi K, Hennighausen L. β -Catenin: a transforming actor on many stages. *Breast Cancer Res* 5:63-68, 2003.
- Nagi C, Guttman M, Jaffer S, Qiao R, Keren R, Triana A, Li M, Godbold J, Bleiweiss IJ, Hazan RB. N-cadherin expression in breast cancer: correlation with an aggressive histologic variant – invasive micropapillary carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*. 94:225-235, 2005.
- Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M; Yang Q; Imabun S, Nakahara M, Nakao K, Nakamura M, Mori I, Kakudo K. Flt-4 positive vessel density correlates with vascular endothelial growth factor-D expression, nodal status, and prognosis in breast cancer. *Clin Cancer Res* 9:5313-5317, 2003.
- Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, Imabun S, Nakahara N, Nakamura M, Mori I, Kakudo K. Lymph vessel density correlates with nodal status, VEGF-C expression, and prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 91:125-132, 2005.
- Nakopoulou L, Stefanaki K, Panayotopoulou E, Giannopoulou I, Athanassiadou P, Gakiopoulou-Givalou H, Louvrou A. Expression of the vascular endothelial growth factor receptor-2/Flk-1 in breast carcinomas: correlation with proliferation. *Hum Pathol* 33:863-870, 2002.
- Nakopoulou L, Tsirmpa I, Alexandrou P, Louvrou A, Ampela C, Markaki S, Davaris PS. MMP2-protein in invasive breast cancer and the impact of MMP-2/TIMP-2 phenotype on overall survival. *Breast Cancer Res Treat* 77:145-155, 2003.
- Nassar H. Carcinomas with micropapillary morphology: clinical significance and current concepts. *Adv Anat Pathol* 11:297-303, 2004.
- Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 18:1135-1149, 2000.
- Nicolini A, Campari D, Miccoli P, Spinelli C, Carpi A, Menicagli M, Ferrari P, Gadducci G, Rossi G, Fini M, Giavaresi G, Bonazzi V, Giardino R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and other common tissue prognostic indicators in breast cancer: a case-control study. *Int J Biolog Markers* 19:275-281, 2004.
- Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, Hernandez-Boussard T, Livasy C, Cowan D, Dressler L, Akslen LA, Ragaz J, Gown AM, Gilks CB, van de Rijn M, Perou CM. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 10:5367-5374, 2004.
- Obermair A, Kucera E, Mayerhofer K, Speiser P, Seifert M, Czerwenka K, Kaider A, Leodolter S, Kainz C, Zeillinger R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in human breast cancer: correlation with disease-free survival. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 74:455-458, 1997.
- Oliveira PC, Palmeira C, Lourenço L, Lopes C. Evaluation of DNA content in preneoplastic changes of mouse urinary bladder induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *J Exp Clin Cancer Res* 24:609-616, 2005.
- Ordás J, Millán Y, Espinosa de los Monteros A, Reymundo C, Martín de las Mulas J. Immunohistochemical expression of progesterone receptors, growth hormone and insulin growth factor-I in feline fibroadenomatous change. *Res Vet Science* 76:227-233, 2004.
- Orlandini M, Semboloni S, Oliviero S. β -catenin inversely regulates vascular endothelial growth factor-D mRNA stability. *J Biol Chem* 278:44650-44656, 2003.
- Ottesen GL, Christensen IJ, Larsen JK, Larsen J, Christiansen J, Baldetorp B, Linden T, Hansen B, Andersen JA. DNA ploidy analysis in breast carcinoma. Comparison of unfixed and fixed tissue analyzed by image and flow cytometry. *Anal Quant Cytol Histol* 19:413-422, 1997.

Ottesen GL. Carcinoma in situ of the female breast. A clinico-pathological, immunohistochemical, and DNA ploidy study. *APPMIS* (suppl) 108:1-67, 2003.

Overley B, Shofer FS, Goldschmidt MH, Sherer D, Sorenmo KU. Association between ovariohysterectomy and feline mammary carcinoma. *J Vet Intern Med* 19:560-563, 2005.

Ozawa M. Lateral dimerization of the E-cadherin ectracellular domain is necessary but not sufficient for adhesive activity. *J Biol Chem* 277:196000-19608, 2002.

Papaevangelou A, Pougouras I, Liapi G, Pierrakakis S, Tibishrani M, Setakis N. Cystic adenomyoepithelioma of the breast. *The Breast* 13:356-358, 2004.

Papparella S, Restucci B, Paciello O, Maiolino P. Expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and the activator membrane type 1 (MT1-MMP) in canine carcinomas. *J Comp Pathol*, 126:271-276, 2002.

Pardo A e Selman M. MMP-1: the elder of the family. *Int J Bichemistry & Cell Biol* 37:283-288, 2005.

Paterakos M, Watkin WG, Edgerton SM, Moore DH, Thor AD. Invasive micropapillary carcinoma of the breast: a prognostic study. *Hum Pathol* 30:1459-1463, 1999.

Paul R, Ewing CM, Jarrad DF, Isaacs WB. The cadherin cell-cell adhesuion pathway in prostate cancer progression. *Br J Urol*,79:37-43, 1997.

Pellikainen JM, Ropponen KM, Kataja VV, Kelloski JK, Eskelinen MJ, Kosma V-M. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, HER2, and prognosis. *Clin Cancer Res* 10:7621-7628, 2004.

Pelosi G, Fraggetta F, Maffini F, Solli P, Cavallon A, Viale G. Pulmonary Epithelial-myoepithelial tumor of unproven malignant potential: report of a case and review of the literature. *Mod Pathol* 2001, 14:521-526.

Pepper MS. Lymphangiogenesis and tumor metastasis: myth or reality? *Clin Cancer Res* 7:462-468, 2001.

Pérez Alenza MD, Rutteman GR, Kuipers-Dijkshoorn NJ, Peña L, Montoya A. Flow cytometric analysis of DNA ploidy in canine mammary tumors. *Cancer Res* 48:3411-3417, 1988.

Pérez-Alenza MD, Jiménez A, Nieto AI, Peña L. First description of feline inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical characteristics of tree cases. *Breast Cancer Res* 6:R300-R307, 2004.

Perez-Montiel D, Hes O, Michal M, Suster S. Micropapillary urothelial carcinoma of the upper urinary tract: clinicopathologic study of five cases. *Am J Clin Pathol* 126:1-7, 2006.

Petersen OW, Nielsen HL, Gudjonsson T, Villadsen R, Rønnov-Jessen L, Bissell MJ. The plasticity of human breast carcinoma cells is more than epithelial to mesenchymal conversion. *Breast Cancer Res* 3:213-217, 2001.

Pidgeon GP, Barr MP, Harmey JH, Foley DA, Bouchier-Hayes DJ. Vascular endothelial growth factor (VEGF) upregulates Bcl-2 and inhibits apoptosis in human and murine mammary adenocarcinoma cells. *Br J Cancer* 85:273-278, 2001.

Pignatelli M. E- cadherin: a biological marker of tumour differentiation. *J Pathol* 171:81-82, 1993.

Polakis P. The oncogenic activation of β -catenin. *Curr Opin Genetics Develop* 9:15-21, 1999.

Porrello A, Cardelli P, Spugnini EP. Oncology of companion animals as a model for humans. An overview of tumour histotypes. *J Exp Clin Cancer*. 25:97-105, 2006.

Powell CM, Cranor ML, Rosen PP. Multinucleated stromal giant cells in mammary fibroepithelial neoplasms: A study of 11 patients. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 18:912-916, 1994.

- Press MF, Slamon DJ, Flom KJ, Park J, Zhou JY, Bernstein L. Evaluation of HER-2/neu gene amplification and overexpression: comparison of frequently used assay methods in a molecularly characterized cohort of breast cancer specimens. *J Clin Oncol* 20:3095-3105, 2002.
- Preziosi R, Sarli L, Benazzi C, Mandrioli L, Marcato PS. Multiparametric survival analysis of histological stage and proliferative activity in feline mammary carcinomas. *Res Vet Science* 73:53-60, 2002.
- Pritt B, Weaver DL. Accurate determination of breast cancer size: the role of histopathology and imaging. *Curr Diagn Pathol* 11:435-442, 2005.
- Putti TC, Pinder SE, Elston CW, Lee AHS, Ellis IO. Breast pathology practice: most common problems in a consultation service. *Histopathology* 47:445-457, 2005.
- Queiroga F e Lopes C. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos factores de prognóstico. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 97:119-127, 2002.
- Rakha EA, Putti TC, Abd El-Rehim DM, Paish C, Green AR, Powe DG, Lee AH, Robertson, Ellis IO. Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation. *J Pathol* 208:495-506, 2006.
- Ramalingam P, Middleton LP, Tamboli P, Trancoso P, Silva EG, Ayala AG. Invasive micropapillary carcinoma of the breast metastatic to the urinary bladder and endometrium: diagnostic pitfalls and review of the literature of tumours with micropapillary features. *Ann Diagn Pathol* 7:112-119, 2003.
- Rasbridge SA e Millis RR. Adenomyoepithelioma of the breast with malignant features. *Virchows Arch.* 432:123-130, 1998.
- Reeder JE, Cox C, Whelless LL, Flint A, Liebert M, Grossman HB, and the Bladder Tumor Marker Network. *Cytometry* 28:176-180, 1007.
- Reis AL, Carvalheira J, Schmitt FC, Gärtner F. Immunohistochemical study of E-cadherin expression in canine mammary tumours. *Vet Record* 152:621-624, 2003.
- Reis-Filho J S, Milanezi F, Silva P, Schmitt FC. Maspín expression in myoepithelial tumors of the breast: *Pathol Res Pract* 197:817-821, 2001.
- Reis-Filho JS, Milanezi F, Paredes J, Silva P, Pereira EM, Maeda SA, Carvalho LV, Schmitt FC. Novel and classic myoepithelial/stem cell markers in metaplastic carcinomas of the breast. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 11:1-8, 2003a.
- Reis-Filho J S, Simpson PT, Martins A, Preto A, Gärtner, F, Schmitt FC. Distribution of p63, cytokeratins 5/6 and cytokeratin 14 in 51 normal and 400 neoplastic human tissue samples using TARP-4 multi-tumor tissue microarray. *Virchows Arch* 442:122-132, 2003b.
- Reis-Filho JS, Fulford LG, Crebassa B, Carpentier S, Lakhani SR. Collagenous spherulosis in an adenomyoepithelioma of the breast. *J Clin Pathol* 57:83-86, 2004.
- Reis-Filho JS. Re: Korsching *et al.* The origin of vimentin expression in invasive breast cancer: epithelial-mesenchymal transition, myoepithelial histogenesis or histogenesis from progenitor cells with bilinear differentiation potential? *J Pathol* 206:451-457, 2005. *J Pathol* 207:367-369, 2005.
- Reis-Filho JS, Milanezi F, Carvalho S, Simpson PT, Steele D, Savage K, Lambros MBK, Pereira EM, Nesland JM, Lakhani SR, Schmitt FC. Metaplastic breast carcinomas exhibit EGFR, but not HER2, gene amplification and overexpression: immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization analysis. *Breast Cancer Res* 7:R10281-R1035, 2005.
- Reles AE, Gee C, Schellschmidt A, Unger M, Friedmann W, Lichtenegger W, Press MF. Prognostic significance of DNA content and S-phase fraction in epithelial ovarian carcinomas analyzed by image cytometry. *Gynecol Oncol* 71:3-13, 1998.

Rennstam K, Baldetorp B, Kytölä S, Tanner M, Isola J. Chromosomal Rearrangements and oncogene amplification precede aneuploidization in the genetic evolution of breast cancer. *Cancer Res* 61:1214-1219, 2001.

Restucci B, Papparella S, De Vico G, Maiolino P. E-cadherin expression in normal and neoplastic canine mammary gland. *J Comp Pathol* 116:191-202, 1997.

Restucci B, Papparella S, Maiolino P, De Vico G. Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors. *Vet Pathol* 39:488-493, 2002.

Ribeiro-Silva A, Ramalho LNZ, Garcia SB, Zucoloto S. The relationship between p63 and p53 expression in normal and neoplastic breast tissue. *Arch Pathol Lab Med* 127:336-340, 2003.

Ribeiro-Silva A, Ramalho LNZ, Garcia SB, Brandão DF, Chachud F, Zucoloto S. p63 correlates with both BRCA1 and cytokeratin 5 in invasive breast carcinomas: further evidence for the pathogenesis of the basal phenotype of breast cancer. *Histopathology* 47:458-466, 2005.

Rios-Doria J, Kuefer R, Ethier SP, Day ML. Cleavage of β -catenin by calpain in prostate and mammary tumor cells. *Cancer Res* 64:7237-7240, 2004.

Rocha AS, Soares P, Fonseca E, Cameselle-Teijeiro J, Oliveira MC, Sobrinho-Simões M. E-cadherin loss rather than β -catenin alterations is a common feature of poorly differentiated thyroid carcinomas. *Histopathology* 42:580-587, 2003.

Roels S, van Diest PJ, Belien LAM, Ducatelle R. Computerized image analysis in diagnostic veterinary pathology- Is the era of descriptive veterinary pathology coming to an end? *Eur J Vet Pathol* 4:21-27, 1998.

Roetger A, Merschiann A, Dittmar T, Jackish C, Barnekow A, Brandt B. Selection of potentially metastatic subpopulations expressing c-erbB-2 from breast cancer tissue by use of an extravasation model. *Am J Pathol* 153:1797-1806, 1998.

Rosai J. Breast. In: Ackerman's Surgical Pathology, J Rosai (Ed). 8th ed, vol 2, Mosby, St Louis, pp: 1565-1636, 1996.

Ross JL e Walker RA. Control of matrix metalloproteinase activity in cancer. *J Pathol* 183:377-379, 1997.

Rutteman GR, Cornelisse CJ, Dijkshoorn NJK, Poortman J, Misdorp W. Flow cytometric analysis of DNA ploidy in canine mammary tumors. *Cancer Res* 48:3411-3417, 1988.

Rutteman GR, Misdorp W. Hormonal background of canine and feline mammary tumours. *J Reprod Fert Suppl* 47:483-487, 1993.

Rutteman GR, Withrow SJ, MacEwen EG. In: Tumors of the mammary gland. In Small Animal Clinical Oncology, SW Withrow, EG MacEwen (Eds), 3th ed, W. B. Saunders Co, Philadelphia, 2001.

Sampedro A e Orfao A. ADN cytometric analysis. Serviço de Publicações da Universidade de Oviedo, 1993.

Santos L, Lameiras C, Afonso J, Palmeira C, Pereira S, Costa C, Amaro T, Bento MJ, Morais A, Criado B, Lopes C. Is DNA content alteration a consequence of proliferative and differentiation changes in urothelial bladder tumours? *Acta Urológica* 20:9-17, 2003.

Sakamoto K, Watanabe M, De la Cruz C, Honda H, Ise H, Mitsui K, Namiki K, Mikami Y, Moriya T, Sasano H. Primary invasive micropapillary carcinoma of the colon. *Histopathology*, 47:479-484, 2005.

Santini D, Ceccarelli C, Taffurelli M, Pireli S, Marrano D. Differentiation pathways in primary invasive breast carcinoma as suggested by intermediate filament and biopathological marker expression. *J Pathol* 179:386-391, 1996.

Sarli G, Preziosi R, Benazzi C, Bazzo R, Mandrioli L, Marcato PS. Rate of apoptosis in feline mammary tumors is not predictive of postsurgical survival. *J Vet Diagn Invest* 15:115-122, 2003.

- Sarli G, Preziosi R, De Tolla L, Brunetti B, Benazzi C. E-cadherin immunoreactivity in canine mammary tumors. *Vet Pathol* 42:781-787, 2005.
- Seifert G. Are adenomyoepithelioma of the breast and epithelial-myoepithelial carcinoma of the salivary glands identical tumours? *Virchows Arch* 433:285-287, 1998.
- Seixas F. Neoplasias uroteliais bovinas: contributo para a sua caracterização biopatológica. Tese de Mestrado, Universidade do Porto, 1999.
- Shinohara A, Yokoyama Y, Wan X, Takahashi Y, Mori Y, Takami T, Shimokawa K, Tamaya T. Cytoplasmic/nuclear expression without mutation of exon 3 of the β -catenin gene is frequent in the development of neoplasm of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 82:450-455, 2001.
- Shiozaki H, Oka H, Inoue M, Tamura S, Monden M. E-cadherin mediated adhseion system in cancer cells. *Cancer* 77:1605-1613, 1996.
- Sidoni A, Cavaliere A, D'Amico GAM, Rachelente G, Bucciarelli E. Biopathological significance of single cell DNA aneuploidy measured by static cytometry in breast cancer. *The Breast* 10:325-329, 2001.
- Simpson RHW. Myoepithelial tumours of the salivary glands. *Curr Diagn Pathol* 8:328-337, 2002.
- Simpson RHW. Epithelial-myoepithelial carcinoma. In Proceedings of XIV Porto Cancer Meeting, Porto, pp.32-33, 2005.
- Singh Gill TS, Clarke D, Douglas-Jones AG, Sweetland HM, Mansel RE. Adenomyoepithelioma of the breast: a diagnostic dilemma. *Eur J Surg Oncol* 26:316-318, 2000.
- Skorupski KA, Overlay B, Shofer FS, Goldschmidt MH, Miller CA, Sorenmo KU. Clinical characteristics of mammary carcinoma in male cats. *J Vet Intern Med* 19:52-55, 2005.
- Smith BD, Smith GL, Carter D, Sasaki CT, Haffty BG. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein levels in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 18:2046-2052, 2000.
- Sottile J. Regulation of angiogenesis by extracellular matrix. *Biochimica et Biophysica Acta* 1654:13-22, 2004.
- Sozmen M, Brown PJ, Eveson JW, Scott HW. Epithelial-myoepithelial carcinoma of the salivary gland in two cats. *Eur J Vet Pathol* 4:93-96, 1998.
- Stamenkovic I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Sem Cancer Biol* 10:415-433, 2000.
- Sternlicht MD, Kedeshian P, Shao Z-M, Safarians S, Brasky SH. The human myoepithelial cell is a natural tumor suppressor. *Clin Cancer Res* 3:1949-1958, 1997.
- Sternlicht MD e Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behaviour. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:463-516, 2001.
- Sweeney P, Karashima T, Kim SJ, Keadr D, Mian B, Huang S, Baker C, Fan Z, Hicklin DJ, Pettaway CA, Dinney CPN. Anti-vascular endothelial growth factor receptor 2 antibody reduces tumorigenicity and metastasis in orthotopic prostate cancer xenografts via induction of endothelial apoptosis and reduction of endothelial cell matrix metalloproteinase type 9 production. *Clin Cancer Res* 8:2714-2724, 2002.
- Szabo S, Haislip AM, Garry RF. Of Mice, cat, and men: is human breast cancer a zoonosis? *Microscopy Research and Technique* 68:197-208, 2005.
- Tachibana MD, Miyakawa A, Miyakawa M, Saito S, Nakamura K, Baba S, Murai M. Prognostic significance of flow cytometric measurements of deoxyribonucleic acid for patients with superficial bladder cancer: a long term follow-up study. *Cancer Detect Prev* 23:155-162, 1999.

Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 55:3964-3968, 1995.

Talvensaari-Mattila A, Pääkkö P, Höyhtyä, Blanco-Sequeiros G, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 immunoreactive protein. A marker of aggressiveness in breast carcinoma. *Cancer* 83:1153-1162, 1998.

Tanabe S, Nakadai T, Furuoka H, Oomachi T, Kobayashi Y, Omata Y, Koyama T, Hondo E, Uzuka Y, Sarashina T, Ducusin RJT, Shida T, Dorf ME. Expression of mRNA of chemokine receptor CXCR4 in feline mammary adenocarcinoma. *Vet. Record* 151:729-733, 2002.

Tanner MN, Karhu RA, Nupponen NN, Borg A, Baldetorp B, Pejovic T, Fernö M, Killander D, Isola JJ. Genetic aberrations in hypodiploid breast cancer. Frequent loss of chromosome 4 and amplification of cyclin D1 oncogene. *Am J Pathol* 153:191-199, 1998.

Tavassoli FA, Soares J. Myoepithelial lesions. In: Tumours of the breast and female genital organs - Pathology and genetics. FA Tavassoli e P Deville (Eds), World Health Organization Classification of Tumours, IARC Press, Lyon, pp86-88, 20003.

Thor AD, Eng C, Devries S, Paterakos M, Watkin WG, Edgerton S, Moore DH, Etzell J, Waldman FM. Invasive micropapillary carcinoma of the breast is associated with chromosome 8 abnormalities detected by comparative genomic hybridization. *Hum Pathol*, 33:628-631, 2002.

Tlsty TD e Coussens LM. Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 1:119-150, 2006.

Torng P-L, Mao T-L, Chan W-Y, Huang S-C, Lin C-T. Prognostic significance of stromal metalloproteinase-2 in ovarian adenocarcinoma and its relation to carcinoma progression. *Gynecol Oncol* 92:559-567, 2004.

Tse GMH, Lui PCW, Soon Lee C, Lung FYL, Scolyer RA, Law BKB, Lau T-S, Karim R, Putti TC. Stromal expression of Vascular endothelial growth factor correlates with grade and microvessel density in mammary phyllodes tumors: a multicentric study of 185 cases. *Hum Pathol* 35:1053-1057, 2004.

Tse GM, Tan P-H, Chaiwun B, Putti TC, Lui PCW, Tsang AKH, Wong FCL, Lo AWI. P63 is useful in the diagnosis of mammary metaplastic carcinomas. *Pathology* 38:16-20, 2006.

Tsumagari K, Sakamoto G, Akiyama F, Kasumi F. The clinicopathological study of invasive micropapillary carcinoma of the breast. *Jpn J Breast Cancer* 16:341-348, 2001.

Turashvili G, Bouchal J, Burkadze G, Kolář Z. Differentiation of tumours of ductal and lobular origin: I. Proteosomics of invasive ductal and lobular breast carcinomas. *Biomed Papers* 149:57-62, 2005.

Vajkoczy P, Farhadi M, Gaumann A, Heidenreich R, Erber R, Wunder A, Tonn JC, Mengers MD, Breier G. Microtumor growth initiates angiogenic sprouting with simultaneous expression of VEGF, VEGF receptor - 2, and angiopoietin-2. *J Clin Invest* 109:777-785, 2002.

Vallorosi CJ, Day KC, Zhao X, Rashid MG, Rubin MA, Johnson KR, Wheelock MJ, Day ML. Truncation of the β -catenin binding domain of E-cadherin precedes epithelial apoptosis during prostate and mammary involution. *J Biol Chem* 275:3328-3334, 2000.

Van de Vijver MJ, He YD, Van't Veer LJ, Dai H, Hart AAM, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M, Atsma D, Witteveen A, Glas A, Delahaye L, Van der Velde T, Bartelink H, Rodenhuis S, Rutgers ET, Friend SH, Bernards R. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 347:1999-2009, 2002.

Valente G, Mamo C, Bena A, Prudente E, CavaliereC, Kerim S, Nicotra G, Comino A, Palestro G, Isidoro C, Beatrice F. Prognostic significance of microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in sinonasal carcinomas. *Hum Pathol*, 37:391-400, 2006.

- Van Aken E, De Wever O, Correia da Rocha AS, Mareel M. Defective E-cadherin/catenin complexes in human cancer. *Virchows Arc* 439:725-751, 2001.
- Van de Putte G, Kristensen GB, Baekelandt M, Lie AK, Holm R. E-cadherin and cateninas in early squamous cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 94:521-527, 2004.
- Viacava P, Naccarato AG, Bocci G, Fanelli G, Arteni P, Lonobile A, Evangelista G, Montruccoli G, Bevilacqua G. Angiogenesis and VEGF expression in pre-invasive lesions of the human breast. *J Pathol* 204:140-146, 2004.
- Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry. *Circ Res* 92:827-839, 2003.
- Viste JR, Myers SL, Singh B, Simko E. Feline mammary adenocarcinoma: tumor size as a prognostic indicator. *Can Vet J* 43:33-37, 2002.
- Vleminckx K e Kemler R. Cadherins and tissue formation: integrating adhesion and signaling. *BioEssays* 21:211-220, 1999.
- Vleminckx K, Vakaet Jr L, Mareel M, Fiers W, Van Roy F. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumour cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 107-119, 1991.
- Vogel VG. Atypia in the assessment of breast cancer risk: implications for management. *Diagn Cytopathol* 30:151-157, 2004.
- Vu TH e Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* 14:2123-2133, 2000.
- Walker RA. The erbB/HER type 1 tyrosine kinase receptor family. *J Pathol* 185:234-235, 1998.
- Wehrend A, Hospes R, Gruber AD. Treatment of feline mammary fibroadenomatous hyperplasia with a progesterone-antagonist. *Vet Record* 148:346-347, 2001.
- Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, Meli S, Gasparini G. Tumour angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 84:1875-1886, 1992.
- Weidner N. Tumoural vascularity as a prognostic factor in cancer patients: the evidence continues to grow. *J Pathol* 184:119-122, 1998.
- Wen X-F, Shen Z, Shen Z-Z, Nguyen M, Shao Z-M. The expression of ER protein correlates with vascular endothelial growth factor and its prognostic significance in human breast cancer. *Oncol Rep* 9:937-944, 2002.
- Werling RW, Hwang H, Yaziji H, Gown AM. Immunohistochemical distinction of invasive from noninvasive breast lesions: a comparative study of p63 versus calponin and smooth muscle myosin heavy chain. *Am J Surg Pathol* 27:82-90, 2003.
- Wheelock MJ, Peralta Soler A, Knudsen KA. Cadherin junctions in mammary tumors. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6:275-285, 2001.
- Willipinski-Stapelfeldt B, Riethdorf S, Assmann V, Woelfle U, Rau T, Sauter G, Heukeshoven J, Pantel K. Changes in cytoskeletal protein composition indicative of an epithelial-mesenchymal transition in human micrometastatic and primary breast carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 11:8006-8014, 2005.
- Wilson RW and Moran C. Epithelial-myoepithelial carcinoma of the lung: Immunohistochemical and ultrastructural observations and review of the literature. *Hum Pathol* 28:631-635, 1997.
- Wijnhoven BPL, Dinjens WNM, Pignatelli M. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br J Surg* 87:992-1005, 2000.

Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, von Andrian UH, Deryugina EI, Strongin AY, Brocker E-B, Friedl P. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-ameboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol* 160:267-277, 2003.

Wrobel KH, Bickel D, Kujat R. Immunohistochemical study of seminiferous epithelium in adult bovis testis using monoclonal antibodies against Ki-67 and Proliferating Cell Nuclear antigen (PCNA). *Cell Tissue Res* 283:191-201, 1996.

Xie K, Wei D, Shi Q, Huang S. Constitutive and inducible expression and regulation of vascular endothelial growth factor. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 15:297-324, 2004.

Xu X, Wang Y, Chen Z, Sternlicht MD, Hidalgo M, Steffenson B. Matrix metalloproteinase-2 contributes to cancer cell migration on collagen. *Cancer Res* 65:130-136, 2005.

Yoshida R, Kimura N, Harada Y, Ohuchi N. Loss of E-cadherin expression in breast cancer. *Int J Oncol* 18:513-520, 2001.

Yoshiji H, Buck TB, Harris SR, Ritter LM, Lindsay CK, Thorgeirsson UP. Stimulatory effect of endogenous tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) overexpression on type IV collagen and laminin gene expression in rat mammary carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 247:605-609, 1998.

Yu JL, Rak JW. Inflammatory and immune cells in tumour angiogenesis and arteriogenesis. *Breast Cancer Res* 5:83-88, 2003.

Zuccari DAP, Santana AE, Cury PM, Cordeiro JA. Immunocytochemical study of Ki-67 as a prognostic marker in canine mammary neoplasia. *Vet Clin Pathol* 33:23-28, 2004.

Zappulli V, De Zan Gabrita, Cardazzo B, Bargelloni L, Castagnaro M. Feline mammary tumours in comparative oncology. *J Dairy Res* 72:98-106, 2005.

Zekioglu O, Erhan Y, Bayramoglu H, Özdemir N. Invasive micropapillary carcinoma of the breast: high incidence of lymph node metastasis with extranodal extension and its immunohistochemical profile compared with invasive ductal carcinoma. *Histopathology*, 44:18-23, 2004.

Zhang RR, Man Y-G, Vang R, Saenger JS, Barner R, Wheller DT, Liang CY, Vinh TN, Bratthauer GL. A subset of morphologically distinct mammary myoepithelial cells lacks corresponding immunophenotypic markers. *Breast Cancer Res* 5:R151-R156, 2003.

ANEXOS

ANEXO I

MÉTODO SEMI-QUANTITATIVO DE NOTTINGHAM, MODIFICADO POR ELSTON E ELLIS

Para a determinação do grau histológico são avaliadas 3 características: a) grau de formação de túbulos (como expressão de diferenciação glandular); b) pleomorfismo nuclear (grau nuclear) e c) contagem mitótica. É utilizado um sistema numérico de 1-3 para avaliar cada item em separado.

Na avaliação da formação de túbulos e estruturas acinares só são contabilizadas estruturas com clara formação de lúmen central, sendo usados como “cut-off” os valores de 10 e 75% da extensão da massa neoplásica.

O pleomorfismo nuclear (grau nuclear) é avaliado tendo como referência a regularidade, forma e tamanho das células epiteliais não neoplásicas presentes na mama adjacente ao tumor. O aumento da variabilidade nuclear e o número e tamanho dos nucléolos são também critérios para avaliar o grau de pleomorfismo nuclear.

A avaliação das figuras de mitose requer a avaliação e contagem de mitoses em 10 campos de grande ampliação (40x) na periferia do tumor; para tal foi utilizada uma ocular com retículo e um microscópio Nikon Labophot[®], com uma área de campo de 0,15mm² para o qual corresponde a pontuação presente no quadro 2.

O valor atribuído independentemente a cada um destes 3 parâmetros analisados é no final adicionado para obter um valor de 3 a 9, que corresponde a um determinado grau:

Grau 1 ou bem diferenciado: 3-5 pontos

Grau 2 ou moderadamente diferenciado: 6-7 pontos

Grau 3 ou pouco diferenciado: 8-9 pontos

Quadro 1- Método de Nottingham para a determinação do grau histológico (Adaptado de Elston e Ellis, 1998).

Parâmetro	Pontuação
Pleomorfismo nuclear (Grau nuclear)	
Núcleos pequenos, uniformes e regulares	1
Aumento moderado do tamanho e variabilidade	2
Variação marcada	3
Formação de túbulos	
Frequente (> 75%)	1
Moderada (10-75%)	2
Reduzida ou ausente (<10%)	3
Contagem mitótica	
Nikon Labophot (objectiva 40x, área de campo 0,152 mm ²)	
0-5 mitoses	1
6-10 mitoses	2
> 11 mitoses	3
Leitz Ortholux (objectiva 25x, área de campo 0,274 mm ²)	
0-9 mitoses	1
10-19 mitoses	2
> 20 mitoses	3
Leitz Diaplan (objectiva 40x, área de campo 0,312 mm ²)	
0-11 mitoses	1
12-22 mitoses	2
> 23 mitoses	3

ANEXO II

Quadro 1. Valores dos índices de proliferação celular nos vários tipos histológicos.

Índices proliferativos	CDI-STE	CEM	C. metaplásico	C. micropapilar	p
Índice mitótico					
Mediana	1,10	0,50	1,70	1,00	0,023
Mínimo-Máximo	0,18-3,70	0,15-1,93	0,10-4,56	0,60-1,26	
Índice Ki-67					
Mediana	41,10	10,60	48,90	38,25	<0,0001
Mínimo-Máximo	20,35-77,70	2,20-27,30	33,40-69,40	19,40-70,35	

Quadro 2. Associação dos índices proliferativos e os critérios clínico-patológicos e imuno-histoquímicos.

Carcinoma (n=93)	Índice mitótico Mediana (min-max)	p	Índice Ki-67 Mediana (min-max)	p
Idade (anos) (n=87)				
<8	0,57 (0,15-2,32)	0,008	23,70 (2,20-76,45)	0,025
8-11	0,99 (0,18-3,69)		41,10 (9,99-69,50)	
>11	1,13 (0,1-3,75)		41,6 (20,35-77,70)	
Tamanho (cm)				
<2	0,8 (0,15- 3,00)	0,008	34,1 (8,00-70,35)	0,025
2-3	1,27 (0,10-4,56)		45,45 (16,7-77,7)	
>3	1,28 (0,54-3,75)		39,5 (2,2-74,04)	
Ulceração				
Ausente	1,06 (0,15-3,69)	0,29	39,14 (2,2-76,45)	0,50
Presente	1,09 (0,10-4,56)		36,6 (9,99-77,70)	
Grau histológico				
Grau I	0,45 (0,30-0,68)	<0,0001	23,90 (9,99-32,80)	0,001
Grau II	0,93 (0,10-3,00)		35,70 (2,20-69,50)	
Grau III	1,32 (0,28-4,56)		45,30 (19,40-77,70)	
Grau nuclear				
Grau 2	0,68 (0,10-3,0)	<0,0001	37,15 (2,20-69,40)	0,28
Grau 3	1,20 (0,28-4,56)		39,79 (8,00-77,70)	
Estadio				
I	0,68 (0,15-3,00)	0,007	31,90 (8,00-69,50)	0,001
II	1,20 (0,10-4,76)		44,96 (19,40-76,60)	
III	1,32 (0,54-3,75)		43,42 (2,20-77,7)	
IV	1,05 (1,03-1,13)		45,6 (39,5-72,27)	
Necrose				
Ausente	0,40 (0,19-0,88)	0,001	11,2 (8,00-46,70)	0,007
Células isoladas	0,64 (0,15-1,10)		32,38 (2,20-70,35)	
Extensa	1,17 (0,10-4,56)		41,25 (9,99-77,70)	
Invasão				
Ausente	0,15	0,006	21,4	0,19
Estroma	0,97 (0,18-3,75)		39,5 (2,20-76,45)	
Muscular	1,49 (0,10-4,56)		36,60 (20,35-77,70)	
Padrão de crescimento				
Expansivo	0,80 (0,15-3,45)	0,002	35,02 (2,20-76,45)	0,009
Infiltrativo	1,32 (0,10-4,56)		44,58 (9,99-77,70)	
Diferenciação epidermóide				
Ausente	0,76 (0,15-2,79)	0,025	32,8 (2,20-74,04)	0,021
Presente	1,12 (0,10-4,56)		41,29 (11,20-77,70)	
Permeação vascular				
Ausente	0,60 (0,15-2,79)	<0,0001	28,20 (2,20-55,90)	<0,0001
Presente	1,36 (0,10-4,56)		45,21 (19,40-77,70)	

Quadro 2 (continuação). Associação dos índices proliferativos e os critérios clínico-patológicos e imuno-histoquímicos.

Carcinoma (n=93)	Índice mitótico Mediana (min-max)	p	Índice Ki-67 Mediana (min-max)	p
Metástase ganglionar				
N0	0,97 (0,10-4,56)	0,012	35,50 (2,20-76,60)	0,003
N1	1,43 (0,57-3,75)		50,03 (27,30-77,70)	
Caderina E				
Preservada	0,74 (0,15-3,45)	0,006	34,7 (2,20-70,35)	0,09
Diminuída	1,20 (0,10-4,56)		31,1 (8,00-77,70)	
B-catenina				
Preservada	1,12 (0,10-4,56)	0,23	38,60 (2,20-76,60)	0,31
Diminuída	1,06 (0,18-3,75)		40,30 (8,00-77,70)	
MMP1				
Baixo	0,86 (0,10-3,00)	0,003	34,36 (2,20-55,90)	0,001
Alto	1,17 (0,27-4,56)		42,52 (8,00-77,70)	
MMP2				
Baixo	0,89 (0,30-1,60)	0,30	39,40 (9,99-69,50)	0,60
Alto	1,10 (0,10-4,56)		38,80 (2,20-77,70)	
TIMP1				
Baixo	1,05 (0,15-2,79)	0,42	36,30 (2,20-77,70)	0,28
Alto	1,13 (0,10-4,56)		41,44 (20,90-76,45)	
VEGF				
Baixo	0,72 (0,18-3,00)	0,009	31,20 (2,20-54,20)	p<0,0001
Alto	1,13 (0,10-4,56)		41,80 (9,99-77,70)	
HER-2/neu				
Negativo	1,10 (0,10-4,56)	0,9	36,50 (2,20-76,60)	0,13
Positivo	1,05 (0,29-3,69)		46,70 (19,40-77,70)	

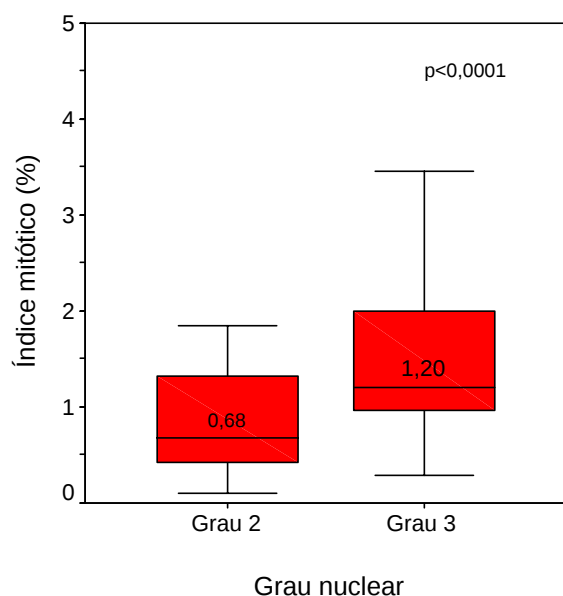


Figura 1: Variação do índice mitótico com o grau nuclear.

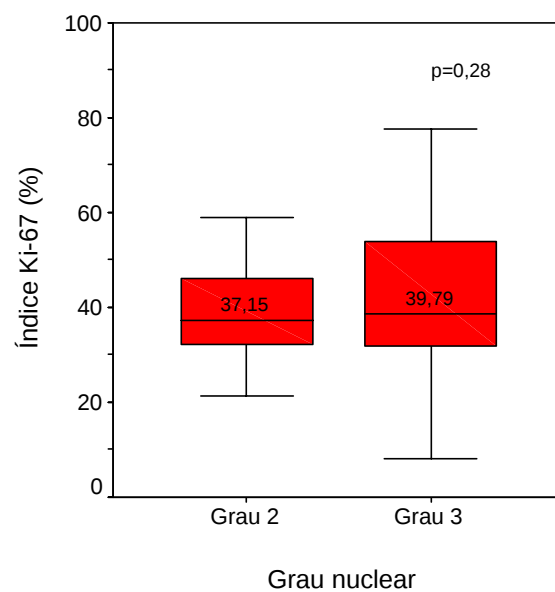


Figura 2: Variação do índice de Ki-67 com o grau nuclear.

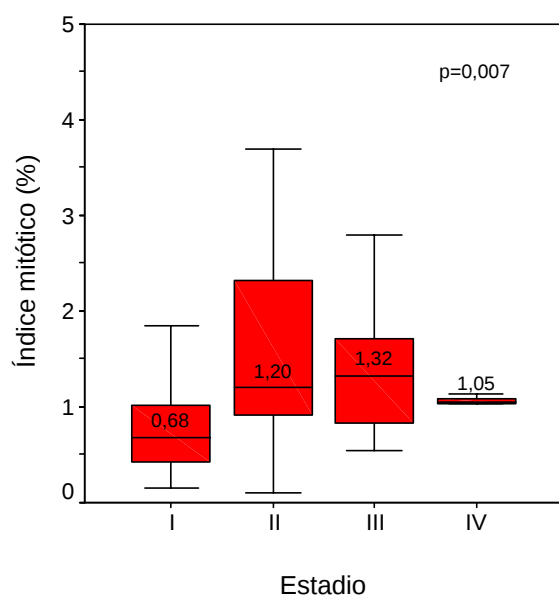


Figura 3: Variação do índice mitótico com o estadio.

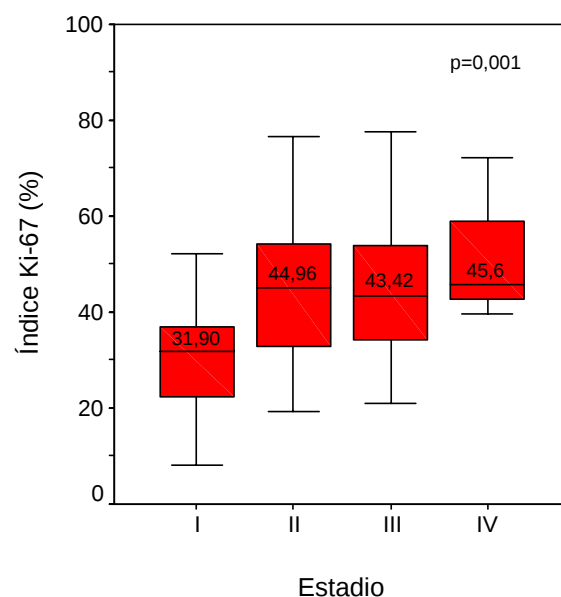


Figura 4: Variação do índice de Ki-67 com o estadio.

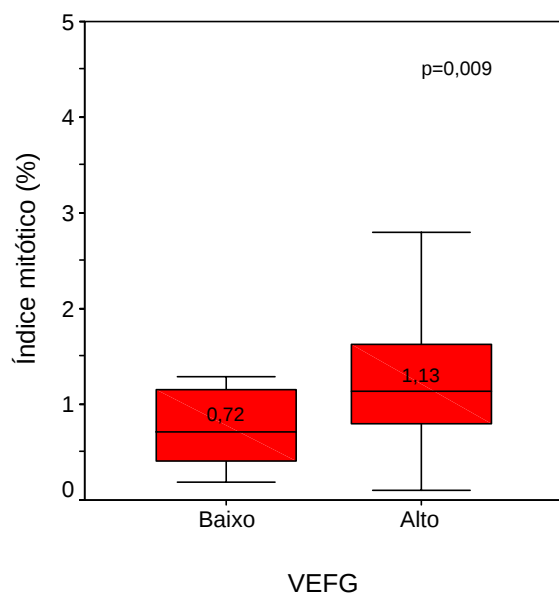


Figura 5: Associação do índice mitótico e a expressão de VEGF.

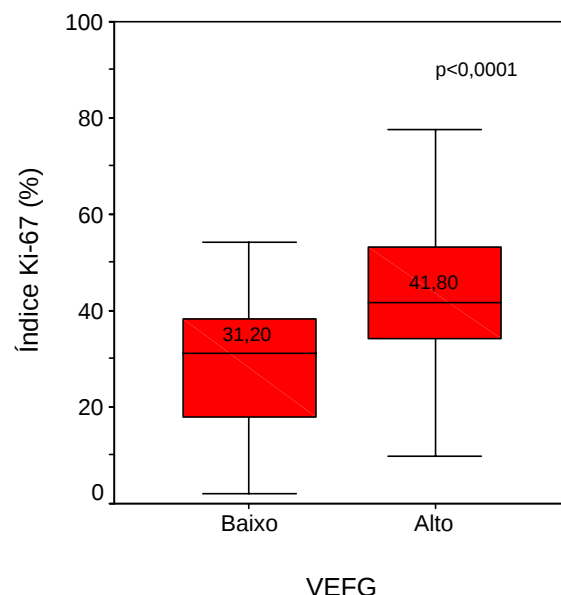


Figura 6: Associação do índice de Ki-67 e a expressão de VEGF.

ANEXO III

Quadro 1. Associação da expressão de MMP1, MMP2 e TIMP1 e as variáveis clínico-patológicas e imuno-histoquímicas.

Malignos n=93	MMP1		MMP2		TIMP1	
	Baixo n (%)	Alto n (%)	Baixo n (%)	Alto n (%)	Baixo n (%)	Alto n (%)
Idade (n=88)						
<8	5 (18,5)	5 (8,3)	0 (0,0)	10 (13,2)	8 (17,09)	2 (5,0)
8-11	10 (37,0)	23 (38,3)	5 (45,5)	28 (36,8)	16 (34,0)	17 (42,5)
>11	12 (44,4)	32 (53,3)	6 (54,5)	38 (50,0)	23 (48,9)	21 (52,5)
	p=0,4		p=0,43		p=0,2	
Tamanho (cm)						
<2	11 (40,7)	20 (30,3)	7 (58,3)	24 (29,6)	19 (38,8)	12 (27,3)
2-3	8 (29,6)	27 (40,9)	3 (25,0)	32 (39,5)	17 (34,7)	18 (40,9)
>3	8 (29,6)	19 (28,8)	2 (16,7)	25 (30,9)	13 (26,5)	14 (31,8)
	p=0,5		p=0,14		p=0,5	
Ulceração						
Ausente	23 (85,2)	41 (62,1)	8 (66,7)	56 (69,1)	36 (73,5)	28 (63,6)
Presente	4 (14,8)	25 (37,9)	4 (33,3)	25 (30,9)	13 (26,5)	16 (36,4)
	p=0,03		p=1,0		p=0,4	
Tipo histológico						
CDI-STE	17 (63,0)	47 (71,2)	10 (83,3)	54 (66,7)	36 (73,5)	28 (63,6)
CEM	6 (22,2)	2 (3,0)	2 (16,7)	6 (7,4)	7 (14,3)	1 (2,3)
C. metaplásico	4 (14,8)	9 (13,6)	0 (0,0)	13 (16,0)	4 (8,2)	9 (20,5)
C. micropapilar	0 (0,0)	8 (12,1)	0 (0,0)	8 (9,9)	2 (4,1)	6 (13,6)
	p=0,007		p=0,2		p=0,027	
Grau histológico						
Grau I	4 (14,8)	1 (1,5)	4 (33,3)	1 (1,2)	4 (8,2)	1 (2,3)
Grau II	16 (59,3)	28 (42,4)	4 (33,3)	40 (49,4)	24 (40,9)	20 (45,5)
Grau III	7 (25,9)	37 (56,1)	4 (33,3)	40 (49,4)	21 (42,9)	23 (52,3)
	p=0,004		P<0,0001		p=0,4	
Grau nuclear						
Grau 2	17 (63,0)	22 (33,3)	7 (58,3)	32 (39,5)	19 (38,8)	20 (45,5)
Grau 3	10 (37,0)	44 (66,7)	5 (41,7)	49 (60,5)	30 (61,2)	24 (54,5)
	p=0,01		p=0,35		p=0,54	
Estadio TNM						
I	11 (10,7)	16 (24,2)	6 (50,0)	21 (25,9)	17 (34,7)	10 (22,7)
II	6 (22,2)	19 (28,8)	3 (25,0)	22 (27,2)	12 (24,5)	13 (29,5)
III/IV	10 (37,0)	31 (47,0)	3 (25,0)	38 (46,9)	20 (40,8)	21 (47,7)
	p=0,28		p=0,19		p=0,45	
Necrose						
Ausente	4 (14,8)	1 (1,5)	2 (16,7)	3 (3,7)	5 (10,2)	0 (0,0)
Células isoladas	3 (11,1)	5 (5,7)	2 (16,7)	6 (7,4)	6 (12,2)	2 (4,5)
Extensa	20 (74,1)	60 (90,9)	8 (66,7)	72 (88,9)	38 (77,6)	42 (95,5)
	p=0,03		p=0,86		p=0,03	
Invasão						
Ausente	1 (3,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,2)	1 (2,0)	0 (0,0)
Estroma	18 (66,7)	41 (62,1)	8 (66,7)	51 (63,0)	34 (69,4)	25 (56,8)
Muscular	8 (29,6)	25 (37,9)	4 (33,3)	29 (35,8)	14 (28,6)	19 (43,2)
	p=0,3		p=0,9		p=0,2	
Padrão crescimento						
Expansivo	11 (40,7)	22 (33,3)	6 (50,0)	27 (33,3)	15 (30,6)	18 (40,9)
Infiltrativo	16 (59,3)	44 (66,7)	6 (50,0)	54 (66,7)	34 (69,4)	26 (59,1)
	p=0,5		p=0,33		p=0,4	
Diferenciação epidermóide						
Ausente	14 (51,9)	13 (19,7)	9 (75,0)	18 (22,8)	18 (36,7)	9 (20,5)
Presente	13 (48,1)	53 (80,3)	3 (25,0)	61 (77,2)	31 (63,3)	35 (79,5)
	p=0,005		p=0,01		p=0,08	
Permeação vascular						
Ausente	16 (59,3)	13 (19,7)	7 (58,3)	22 (27,2)	18 (36,7)	11 (25,0)
Presente	11 (40,7)	53 (80,3)	5 (41,7)	59 (72,8)	31 (63,3)	33 (75,0)
	P<0,0001		p=0,04		p=0,27	
Metástases ganglionares						
N0	23 (85,2)	48 (72,7)	9 (75,0)	62 (76,5)	39 (79,6)	32 (72,7)
N1	4 (14,8)	18 (27,3)	3 (25,0)	19 (23,5)	10 (20,4)	12 (27,3)
	p=0,3		p=1,0		p=0,5	

Quadro 1 (continuação): Associação da expressão de MMP1, MMP2 e TIMP1 e as variáveis clínico-patológicas e imuno-histoquímicas.

Malignos n=93	MMP-1		MMP-2		TIMP-1	
	Baixo n (%)	Alto n (%)	Baixo n (%)	Alto n (%)	Baixo n (%)	Alto n (%)
Infiltrado inflamatório	16 (59,3)	26 (39,4)	6 (50,0)	36 (44,4)	26 (53,1)	16 (36,4)
Escasso	8 (29,6)	17 (25,8)	5 (41,7)	20 (24,7)	16 (32,7)	9 (20,5)
Moderado	3 (11,1)	23 (34,8)	1 (8,3)	25 (30,9)	7 (14,3)	19 (43,2)
Abundante						
	p=0,06		p=0,21		p=0,008	
Caderina E						
Preservada	8 (29,6)	18 (27,3)	1 (8,3)	25 (30,9)	14 (28,6)	12 (27,3)
Diminuída	19 (70,4)	48 (72,7)	11 (91,7)	56 (69,1)	35 (71,4)	32 (72,7)
	p=0,81		p=0,17		p=1,00	
Beta catenina						
Preservada	8 (29,6)	21 (31,8)	4 (33,3)	25 (30,9)	19 (38,8)	10 (22,7)
Diminuída	19 (70,4)	45 (68,2)	8 (66,7)	56 (69,1)	30 (61,2)	34 (77,3)
	p=1,00		p=1,00		p=0,12	
MMP1						
Baixo			6 (50,0)	21 (25,9)	18 (36,7)	9 (20,5)
Alto			6 (50,0)	60 (74,1)	31 (63,3)	35 (79,5)
			p=0,1		p=0,1	
MMP2						
Baixo	6 (22,2)	6 (9,4)			10 (20,4)	2 (4,5)
Alto	21 (77,8)	58 (90,6)			39 (79,6)	42 (95,5)
	p=1,00				p=0,03	
TIMP1						
Baixo	18 (66,7)	31 (47,0)	10 (83,3)	39 (48,1)		
Alto	9 (33,3)	35 (53,0)	2 (16,7)	42 (51,9)		
	p=0,10		p=0,03			
VEGF						
≤3	9 (33,3)	11 (16,7)	6 (50,0)	14 (17,3)	15 (30,6)	5 (11,4)
>3	18 (66,7)	55 (83,3)	6 (50,0)	67 (82,7)	34 (69,4)	39 (88,6)
	p=0,10		p=0,02		p=0,04	

Quadro 2. Associação da expressão de MMP1, MMP2 e TIMP1 e os índices mitótico e de Ki-67.

Malignos n=93	MMP-1		MMP-2		TIMP-1	
	Baixo n (%)	Alto n (%)	Baixo n (%)	Alto n (%)	Baixo n (%)	Alto n (%)
Índice mitótico						
Mediana	0,86	1,17	0,89	1,10	1,05	1,13
Mínimo-Máximo	0,1-3,0	0,27-4,56	0,30-1,60	0,10-4,56	0,15-2,79	0,10-4,56
	p=0,003		p=0,30		p=0,42	
Índice Ki-67						
Mediana	34,4	42,5	39,40	38,80	36,30	41,44
Mínimo-Máximo	2,2-55,9	8,0-77,7	9,99-69,50	2,2-77,70	2,20-77,70	20,90-76,45
	p=0,001		p=0,60		p=0,38	

Quadro 3. Associação da expressão de VEGF e as variáveis clínico-patológicas e imuno-histoquímicas.

Malignos n=93	VEGF		p
	≤3 n (%)	>3 n (%)	
Idade (anos) (n=88)			
<8	4 (21,1)	6 (8,8)	0,12
8-11	9 (47,4)	24 (35,3)	
>11	6 (31,6)	38 (55,9)	
Tamanho (cm)			
<2	10 (50,0)	21 (28,8)	0,07
2-3	8 (40,0)	27 (37,0)	
>3	2 (10,0)	25 (34,2)	
Ulceração			
Ausente	17 (85,0)	47 (64,4)	0,10
Presente	3 (15,0)	26 (35,6)	
Tipo			
CDI-STE	13 (65,0)	51 (70,8)	0,010
CEM	5 (25,0)	3 (4,1)	
C. metaplásico	0 (0,0)	12 (16,7)	
C. micropapilar	2 (10,0)	6 (8,2)	
Grau histológico			
Grau I	4 (20,0)	1 (1,4)	0,001
Grau II	11 (55,0)	33 (45,2)	
Grau III	5 (25,0)	39 (53,4)	
Grau nuclear			
Grau 2	13 (65,0)	26 (35,6)	0,02
Grau 3	7 (35,0)	47 (64,4)	
Estadio TNM			
I	11 (55,0)	16 (21,9)	0,001
II	7 (35,0)	18 (24,7)	
III/IV	2 (10,0)	39 (53,4)	
Necrose			
Ausente	3 (15,0)	2 (2,7)	0,008
Células isoladas	4 (20,0)	4 (5,5)	
Extensa	13 (65,0)	67 (91,8)	
Invasão			
Ausente	0 (0,0)	1 (1,4)	0,45
Estroma	15 (75,0)	44 (60,3)	
Muscular	1 (25,0)	28 (38,4)	
Padrão de crescimento			
Expansivo	11 (55,0)	22 (30,1)	0,06
Infiltrativo	9 (45,0)	51 (69,9)	
Diferenciação epidermóide			
Ausente	11 (55,0)	16 (21,9)	0,01
Presente	9 (45,0)	57 (78,1)	
Permeação vascular			
Ausente	13 (65,0)	16 (21,9)	0,001
Presente	7 (35,0)	57 (78,1)	
Metástases ganglionares (N)			
N0	20 (100,0)	51 (69,9)	0,003
N1	0 (0,0)	22 (30,1)	
Infiltrado inflamatório			
Escasso	12 (60,0)	30 (41,1)	0,24
Moderado	5 (25,0)	20 (27,4)	
Abundante	3 (15,0)	23 (31,5)	

Quadro 3 (continuação). Associação da expressão de VEGF e as variáveis clínico-patológicas e imuno-histoquímicas.

Malignos n=93	VEGF		p
	≤3 n (%)	>3 n (%)	
Caderina E			
Preservada	4 (20,0)	22 (30,1)	0,60
Diminuída	16 (80,0)	51 (69,6)	
Caderina E			
Membranar	4 (20,0)	14 (19,2)	1,00
Aberrante	16 (80,0)	59 (80,8)	
Beta catenina			
Preservada	8 (40,0)	52 (71,2)	0,42
Diminuída	12 (60,0)	21 (28,8)	
Beta catenina			
Membranar	12 (60,0)	30 (41,1)	0,20
Aberrante	8 (40,0)	43 (58,9)	
MMP1			
Baixo	9 (45,0)	18 (24,7)	0,10
Alto	11 (55,0)	55 (75,3)	
MMP2			
Baixo	6 (30,0)	6 (8,2)	0,019
Alto	14 (70,0)	67 (91,8)	
TIMP			
Baixo	15 (75,0)	34 (46,6)	0,04
Alto	5 (25,0)	39 (53,4)	

Quadro 4. Associação da expressão de VEGF e os índices proliferativos.

Índices proliferativos	VEGF		p
	≤3	>3	
Índice mitótico			
Mediana	0,72	1,13	0,009
Mínimo-Máximo	0,18-3,00	0,10-4,56	
Índice Ki-67			
Mediana	31,20	41,80	p<0,0001
Mínimo-Máximo	2,20-54,20	9,99-77,70	

ANEXO IV

Quadro 1. Comparação entre os carcinomas N₀ e N₁ e os critérios clínico-patológicos.

Malignos n=93	Envolvimento ganglionar (N)		p
	N ₀ n (%)	N ₁ n (%)	
Idade (anos) (n=88)			
<8	10 (14,9)	0 (0,0)	0,008
8-11	29 (43,3)	4 (20,0)	
>11	28 (41,8)	16 (80,0)	
Tamanho (cm)			
<2	27 (38,0)	4 (18,2)	0,18
2-3	26 (36,6)	9 (40,9)	
>3	18 (25,4)	9 (40,9)	
Ulceração			
Ausente	49 (69,0)	15 (68,2)	1,00
Presente	22 (31,0)	7 (31,8)	
Tipo histológico			
CDI-STE	51 (71,8)	14 (63,6)	0,40
CEM	7 (9,9)	1 (4,5)	
C. metaplásico	7 (9,9)	5 (22,7)	
C. micropapilar	6 (8,50)	2 (9,1)	
Grau histológico			
Grau I	5 (7,0)	0 (0,0)	0,14
Grau II	36 (50,7)	8 (36,4)	
Grau III	30 (42,3)	14 (63,6)	
Grau nuclear			
Grau 2	31 (43,7)	8 (36,4)	0,63
Grau 3	40 (56,3)	14 (63,6)	
Estadio			
I	27 (38,0)	0 (0,0)	<0,0001
II	25 (35,2)	0 (0,0)	
III/IV	19 (26,8)	22 (100,0)	
Necrose			
Ausente	4 (14,8)	1 (1,5)	0,03
Células isoladas	3 (11,1)	5 (5,7)	
Extensa	20 (74,1)	60 (90,9)	
Invasão			
Ausente	1 (1,4)	0 (0,0)	0,70
Estroma	46 (64,8)	13 (59,1)	
Muscular	24 (33,8)	9 (40,9)	
Permeação vascular			
Ausente	29 (40,8)	0 (0,0)	<0,0001
Presente	42 (59,2)	22 (100,0)	
Caderina E			
Preservada	19 (26,8)	7 (31,8)	0,80
Diminuída	52 (73,2)	15 (68,2)	
Caderina E			
Membranar	17 (23,9)	1 (4,5)	0,06
Aberrante	54 (76,1)	21 (95,5)	
β-catenina			
Preservada	21 (29,6)	8 (36,4)	0,80
Diminuída	50 (70,4)	14 (63,6)	
β-catenina			
Membranar	33 (46,5)	9 (40,9)	0,80
Aberrante	38 (53,3)	38 (59,1)	

Quadro 1 (continuação). Comparação entre os carcinomas N₀ e N₁ e os critérios clínico-patológicos.

Malignos n=93	Envolvimento ganglionar (N)		p
	N ₀ n (%)	N ₁ n (%)	
Caderina E/ β-catenina			
Preservada	12 (16,9)	6 (27,3)	0,36
Diminuída	59 (83,1)	16 (72,7)	
MMP1			
Baixo	23 (32,4)	4 (18,2)	0,30
Alto	48 (67,6)	18 (81,8)	
MMP2			
Baixo	9 (12,7)	3 (13,6)	1,00
Alto	62 (87,3)	19 (86,4)	
TIMP1			
Baixo	39 (54,9)	10 (45,5)	0,50
Alto	32 (45,1)	12 (54,5)	
VEGF			
≤ 3	20 (28,2)	0 (0,0)	0,003
> 3	51 (71,8)	22 (100,0)	
HER-2/neu			
≤ 3	59 (83,1)	17 (77,3)	0,50
> 3	12 (16,9)	5 (22,7)	

Quadro 2. Comparação dos Índices proliferativos dos carcinomas N₀ e N₁.

Índices proliferativos	Carcinomas		p
	N ₀	N ₁	
Índice mitótico			
Mediana	0,97	1,43	0,012
Mínimo-Máximo	0,10-4,56	0,57-3,75	
Índice Ki-67			
Mediana	35,50	50,03	0,003
Mínimo-Máximo	2,20-76,60	27,30-77,70	

ANEXO V

Quadro 1. Comparação da expressão das variáveis imuno-histoquímicas entre os tumores primários e as suas metástases.

Parâmetro	Tumor primário	Metástase	p
Caderina E			
Preservada	7 (31,8)	8 (36,4)	1,00
Diminuída	15 (68,2)	14 (63,6)	
β-Catenina			
Preservada	8 (36,4)	6 (27,3)	0,75
Diminuída	14 (63,6)	16 (72,7)	
Caderina E/ β-Catenina			
Preservada	6 (27,3)	5 (22,7)	1,00
Diminuída	16 (72,7)	17 (77,30)	
MMP1			
Baixo	4 (18,2)	4 (18,2)	1,0
Alto	18 (81,8)	18 (81,8)	
MMP2			
Baixo	3 (13,6)	4 (20,0)	0,66
Alto	19 (86,4)	16 (80,0)	
TIMP1			
Baixo	10 (45,5)	11 (50,0)	1,00
Alto	12 (54,5)	11 (50,0)	
VEGF			
≤ 3	0 (0,0)	1 (4,5)	1,00
> 3	22 (100,0)	21 (95,5)	

Quadro 2: Correlação da expressão de Caderina E e Beta Catenina nos tumores primários e respectivas metástases.

	n	Beta Catenina		p
		Preservada	Diminuída	
Caderina E				
Preservada	15	11 (78,6)	4 (13,3)	<0,001
Diminuída	29	3 (21,4)	26 (86,7)	
Total	44	14	30	

ANEXO VI

Quadro 1: Associação da multifocalidade com os critérios clínico-patológicos.

Variáveis	Lesões		p
	Solitárias n (%)	Multiplas n (%)	
Tipo histológico			
Alterações não neoplásicas	16 (43.2)	4 (4.9)	<0.0001
Neoplasias benignas	3 (8.1)	9 (11.0)	
Neoplasias malignas	18 (48.6)	69 (84.1)	
Raça			
Europeu	27 (73.0)	49 (59.8)	0.4
Siamês	7 (18.9)	27 (32.9)	
Persa	1 (2.7)	2 (2.4)	
Cruzado	2 (5.4)	4 (4.9)	
Idade (anos) n=112			
<8	15 (44.1)	14 (17.9)	0.008
8-11	12 (35.3)	30 (38.5)	
>11	7 (20.6)	34 (43.6)	
Cadeia mamária (n=77)			
Direita	6 (24.0)	14 (29.8)	0.005
Esquerda	19 (76.0)	20 (42.6)	
Ambas	0 (0.0)	13 (27.7)	
Localização (n=81)			
Torácica (par 1/2)	10 (33.3)	14 (27.5)	0.001
Abdominal (par 3/4)	20 (66.7)	19 (37.3)	
Ambos os pares	0 (0.0)	18 (53.3)	
Contracepção (n=77)			
Não	6 (27.3)	16 (29.6)	1.0
Sim	16 (72.7)	38 (70.4)	
Tamanho (cm)			
<2	14 (37.8)	30 (36.6)	0.26
2-3	9 (24.3)	31 (37.8)	
>3	14 (37.8)	21 (25.6)	
Ulceração			
Ausente	32 (86.5)	64 (78.0)	0.32
Presente	5 (13.5)	18 (22.0)	
Necrose			
Ausente	19 (51.4)	16 (19.5)	0.001
Presente	18 (48.6)	66 (80.5)	
Invasão			
Ausente	10 (54.1)	14 (17.1)	<0.0001
Presente	17 (45.9)	68 (82.9)	
Tipo de crescimento			
Expansivo	26 (70.3)	39 (47.6)	0.03
Infiltrativo	11 (29.7)	43 (52.4)	
Diferenciação. epidermóide			
Ausente	24 (64.9)	34 (41.5)	0.03
Presente	13 (35.1)	48 (58.5)	
Permeação vascular			
Ausente	25 (67.6)	37 (45.1)	0.03
Presente	12 (32.4)	45 (54.9)	
Metastização ganglionar (N)			
N0	36 (97.3)	63 (76.8)	0.007
N1	1 (2.7)	19 (23.2)	

ANEXO VII

Quadro1. Índices mitótico e de antígeno Ki-67 das alterações/lesões mamárias analisadas.

Índices proliferativos	Alterações não neoplásicas	Neoplasias benignas	Neoplasias malignas	p
Índice mitótico				
Mediana	0,50	0,15	1,07	<0,0001
Mínimo-Máximo	0,00-0,90	0,10-0,67	0,10-4,56	
Índice Ki-67				
Mediana	17,80	8,60	38,54	<0,0001
Mínimo-Máximo	5,20-37,25	1,50-15,12	2,20-77,70	

Quadro 2. Análise comparativa dos índices de proliferação celular das alterações fibroadenomatosas (AFTs) e dos fibroadenomas.

Índices proliferativos	AFT	Fibroadenoma	p
Índice mitótico			
Mediana	0,60	0,17	0,003
Mínimo-Máximo	0,10-0,90	0,10-0,30	
Índice ki-67			
Mediana	20,42	9,05	<0,0001
Mínimo-Máximo	15,60-37,25	1,50-12,50	

Quadro 3. Análise comparativa dos índices de proliferação das alterações fibroadenomatosas (AFTs) e fibroquísticas (AFQs).

Índices proliferativos	AFQ	AFT	p
Índice mitótico			
Mediana	0,00	0,60	0,003
Mínimo-Máximo	0,00-0,30	0,10-0,90	
Índice ki-67			
Mediana	9,60	20,42	p<0,0001
Mínimo-Máximo	5,20-14,40	15,60-37,25	

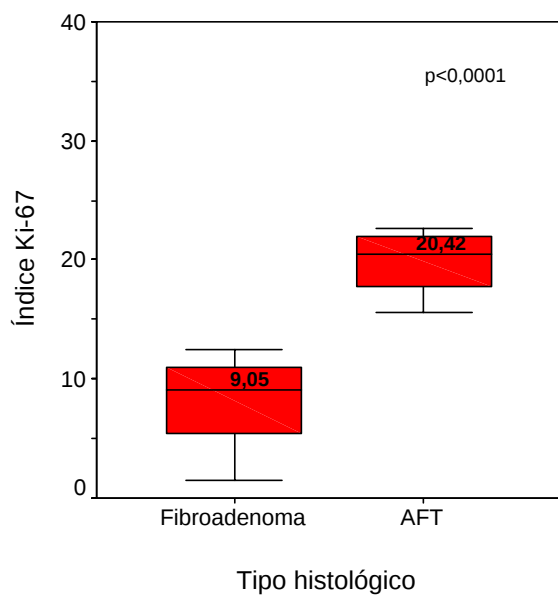


Fig. 1. Comparação do índice de antígeno Ki-67 entre alterações fibroadenomatosas (AFT) e fibroadenomas.

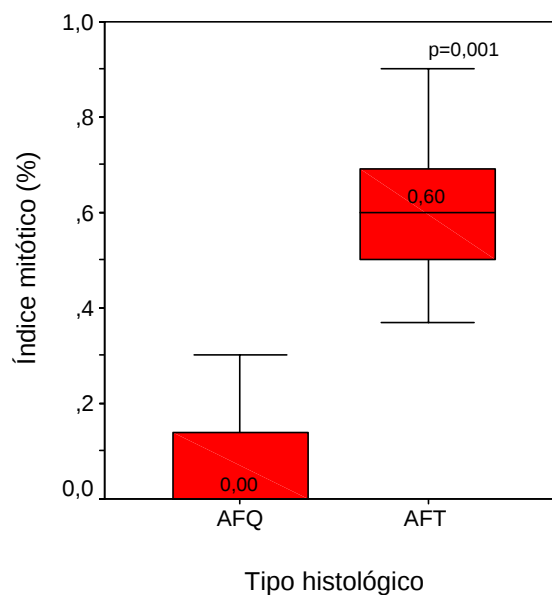


Fig.2. Comparação do índice mitótico entre as alterações fibroadenomatosas (AFT) e as alterações fibroquísticas (AFQ).

Quadro 4. Comparação dos índices de proliferação celular entre os carcinomas e as alterações mamárias presentes na sua periferia.

Índices proliferativos	AFQ (n=39)	CDIS (n=25)	Carcinoma (n=93)	p
Índice mitótico				
Mediana	0,10	1,20	1,08	<0,0001
Mínimo-Máximo	0,00-0,50	0,29-3,69	0,10-4,56	
Índice Ki-67				
Mediana	6,80	44,96	38,78	<0,0001
Mínimo-Máximo	1,30-28,90	9,99-77,70	2,20-77,70	

ANEXO VIII

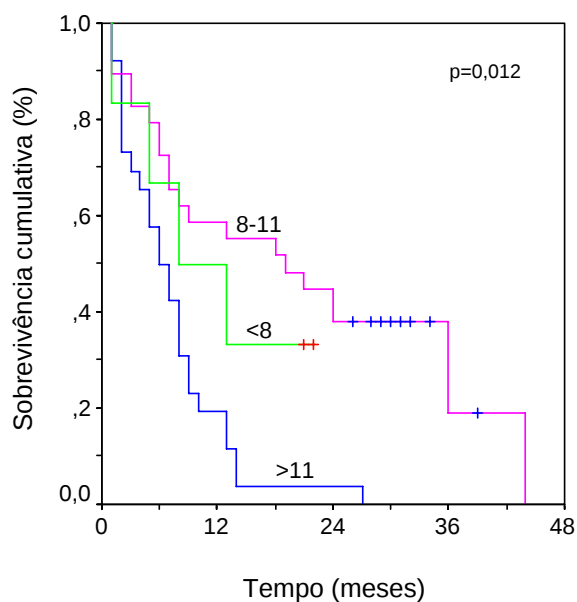


Fig. 1. Associação da sobrevivência total com a idade.

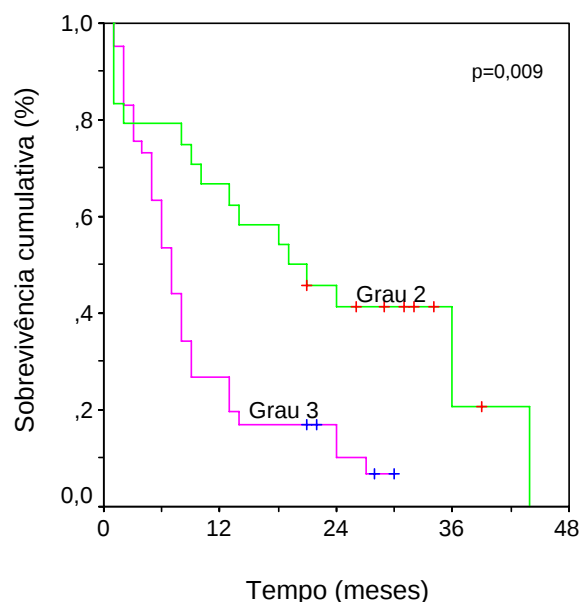


Fig. 2. Associação da sobrevivência total com o grau nuclear.

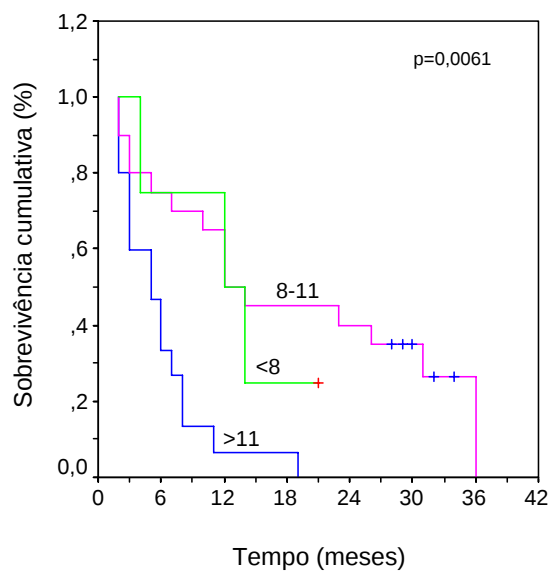


Fig. 3. Associação da sobrevivência livre de doença com a idade.

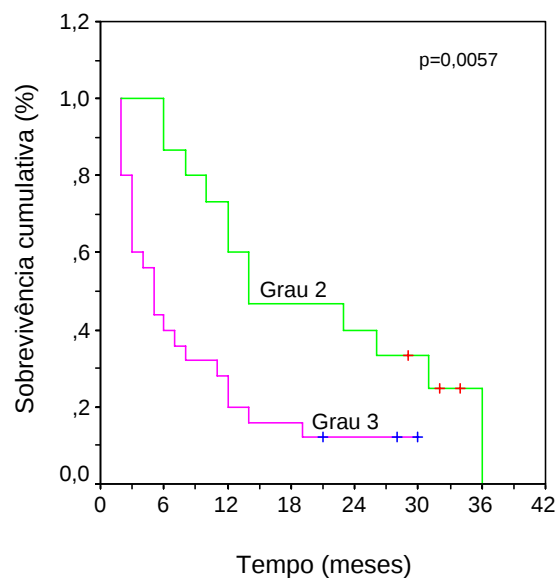


Fig. 4. Associação da sobrevivência livre de doença com o grau nuclear.

Quadro 1 Análise univariada da sobrevivência total em gatas com gânglios linfáticos negativos (n=48) e comparação com os parâmetros clínico-patológicos e imunohistoquímicos.

Variáveis	n	Sobrevivência cumulativa		Tempo mediano de ST (meses)	p
		Aos 12 meses n (%)	No fim do período de seguimento n (%)		
Idade (anos) (n=45)					
<8	6	3 (50,0)	3 (33,3)	8	0,18
8-11	26	17 (65,4)	8 (30,8)	21	
>11	13	5 (38,5)	0 (0,0)	9	
Tamanho (cm)					
<2	20	15 (75,0)	7 (35,0)	18	0,0041
2-3	16	9 (56,3)	4 (25,0)	13	
>3	12	3 (25,0)	0 (0,0)	6	
Ulceração					
Ausente	35	21 (60,0)	10 (28,6)	14	0,25
Presente	13	6 (46,2)	1 (7,7)	9	
Tipo histológico					
CDIS	1	1 (100,0)	1 (100,0)	--	0,001
CEM	5	4 (80,0)	4 (80,0)	-- (média 31,4)	
CDI-STE	35	22 (62,9)	6 (17,1)	14	
C. metaplásico	3	0 (0,0)	0 (0,0)	3	
C micropapilar	4	0 (0,0)	0 (0,0)	4	
Grau histológico (n=47)					
Grau I	4	4 (100,0)	2 (50,0)	36	<0,0001
Grau II	22	19 (86,4)	8 (36,4)	24	
Grau III	21	3 (14,3)	0 (0,0)	7	
Grau nuclear					
Grau 2	19	16 (84,2)	7 (36,8)	36	0,0022
Grau 3	29	11 (37,9)	4 (13,8)	8	
Estadio					
I	21	16 (76,2)	9 (42,9)	24	0,0036
II	13	7 (53,9)	2 (15,4)	13	
III/IV	14	4 (28,6)	0 (0,0)	7	
Necrose					
Ausente	2	2 (100,0)	0 (0,0)	--	0,26
Células isoladas	5	4 (80,0)	2 (40,0)	24	
Extensa	41	21 (51,2)	7 (17,1)	13	
Invasão					
Ausente	1	1 (100,0)	1 (100,0)	--	0,49
Estroma	30	15 (56,7)	8 (26,7)	13	
Muscular	17	9 (52,9)	2 (11,7)	13	
Diferenciação epidermóide					
Ausente	12	8 (66,7)	4 (33,3)	18	0,51
Presente	36	19 (52,8)	7 (19,4)	13	
Padrão de crescimento					
Expansivo	15	8 (53,3)	6 (40,0)	18	0,51
Infiltrativo	33	19 (57,6)	5 (15,2)	13	
Permeação vascular					
Ausente	20	15 (75,0)	10 (50,0)	36	0,0021
Presente	28	12 (42,9)	1 (3,6)	8	
Índice mitótico					
Baixo (<1.1)	26	18 (69,2)	10 (38,5)	21	0,017
Alto (≥1.1)	22	9 (40,9)	1 (4,6)	8	
Índice de Ki 67					
Baixo (<35.5)	27	19 (70,4)	9 (33,3)	24	0,049
Alto (≥35.5)	21	7 (33,3)	2 (9,5)	8	

Quadro 1 (continuação) Análise univariada da sobrevivência total em gatas com gânglios linfáticos negativos (n=48) e comparação com os parâmetros clínico-patológicos e imunohistoquímicos.

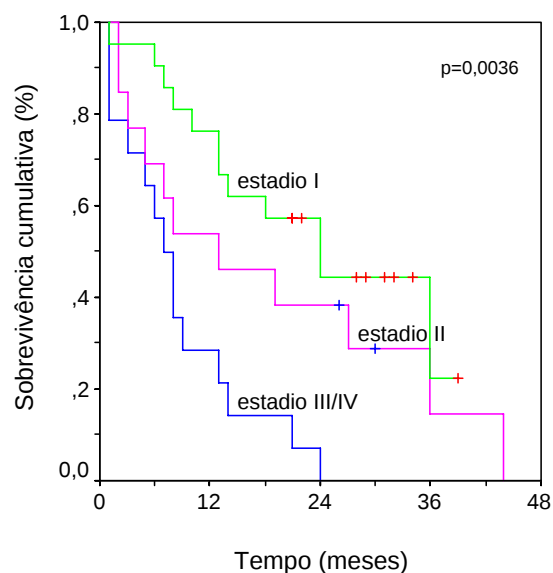
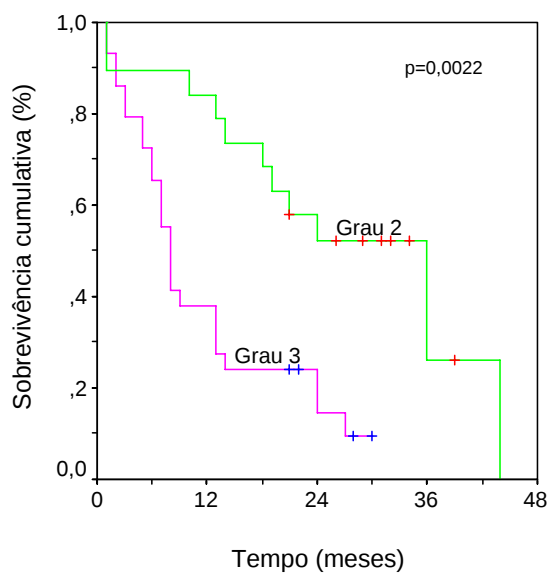
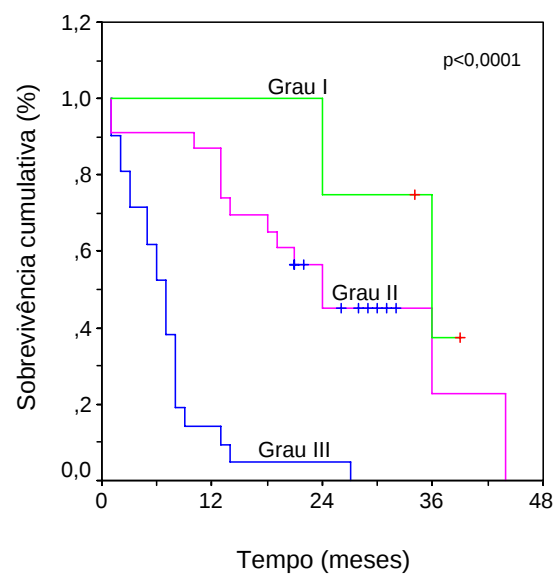
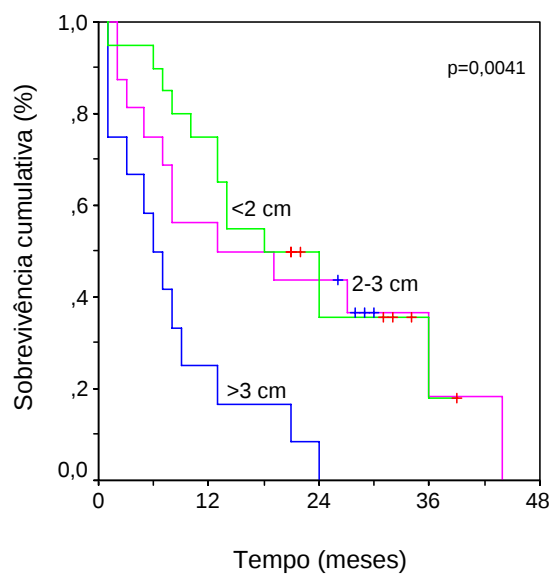
Variáveis	n	Sobrevivência cumulativa		Tempo mediano de ST (meses)	p
		Aos 12 meses n (%)	No fim do período de seguimento n(%)		
Caderina E					
Preservada	19	10 (71,4)	5 (35,7)	14	0,28
Diminuída	29	17 (50,0)	6 (17,7)	8	
β-Catenina					
Preservada	15	8 (53,3)	3 (20,0)	13	0,96
Diminuída	33	19(57,6)	8 (24,2)	13	
MMP1					
Baixo	14	9 (64,3)	3 (35,7)	24	0,32
Alto	34	18 (52,9)	6 (17,7)	13	
MMP2					
Baixo	7	5 (71,4)	3 (42,9)	24	0,39
Alto	41	22 (53,7)	8 (19,5)	13	
TIMP1					
Baixo	25	13 (52,0)	6 (24,0)	13	0,65
Alto	23	14 (60,9)	5 (21,7)	14	
VEGF					
<3	13	9 (69,2)	4 (30,8)	19	0,49
≥3	35	18 (41,4)	7 (20,05)	13	
HER-2/neu					
Negativo	35	22 (62,9)	2 (22,9)	14	0,17
Positivo	6	2 (25,0)	1 (12,5)	7	

Quadro 2 Análise univariada da sobrevivência livre de doença em gatas com gânglios linfáticos negativos (n=34) e comparação com os parâmetros clínico-patológicos e imunohistoquímicos.

Variáveis	n	Sobrevivência cumulativa		Tempo mediano de SLD (meses)	p
		Aos 12 meses n (%)	No fim do período de seguimento n(%)		
Idade (anos) (n=33)					
<8	4	2 (50,0)	1 (25,0)	12	0,018
8-11	19	10 (52,6)	5 (26,3)	14	
>11	10	1 (10,0)	0 (0,0)	6	
Tamanho (cm)					
<2	16	6 (37,5)	3 (18,8)	18	0,04
2-3	13	8 (61,5)	3 (23,8)	19	
>3	19	0 (0,0)	0 (0,0)	5	
Ulceração					
Ausente	25	12 (48,0)	6 (24,0)	12	0,39
Presente	9	2 (22,2)	0 (0,0)	11	
Tipo histológico					
CDIS	1	1 (100,0)	1 (100,0)	--	0,0086
CEM	4	4 (100,0)	2 (50,0)	31	
CDI-STE	26	9 (34,6)	3 (11,5)	11	
C. metaplásico	1	0 (0,0)	0 (0,0)	3	
C micropapilar	2	0 (0,0)	0 (0,0)	3	
Grau histológico (n=33)					
Grau I	2	2 (100,0)	1 (50,0)	31	<0.0001
Grau II	18	10 (55,6)	4 (22,2)	14	
Grau III	13	1 (7,7)	0 (0,0)	4	

Quadro 2 (continuação) Análise univariada da sobrevivência livre de doença em gatas com gânglios linfáticos negativos (n=34) e comparação com os parâmetros clínico-patológicos e imunocitoquímicos.

Variáveis	n	Sobrevivência cumulativa		Tempo mediano de SLD (meses)	p
		Aos 12 meses	No fim do período de seguimento		
		n (%)	n(%)		
Grau nuclear					
Grau 2	15	9 (60,0)	3 (20,0)	14	0,03
Grau 3	19	5 (26,3)	3 (15,8)	7	
Estadio					
I	17	8 (47,1)	5 (29,4)	12	0,06
II	11	6 (55,6)	1 (9,1)	14	
III/IV	6	0 (0,0)	0 (0,0)	5	
Necrose					
Ausente	2	2 (100,0)	1 (50,0)	14	0,26
Células isoladas	5	4 (80,0)	2 (40,0)	24	
Extensa	41	21 (51,2)	7 (17,1)	13	
Invasão					
Ausente	1	1 (100,0)	1 (100,0)	--	0,20
Estroma	20	10 (50,0)	4 (20,0)	12	
Muscular	17	3 (23,1)	1 (7,8)	7	
Diferenciação epidermóide					
Ausente	8	4 (50,0)	2 (25,0)	11	0,63
Presente	26	10 (38,5)	4 (15,4)	12	
Padrão de crescimento					
Expansivo	12	5 (41,7)	3 (25,0)	10	0,86
Infiltrativo	22	9 (40,9)	3 (13,6)	12	
Permeação vascular					
Ausente	16	10 (62,5)	6 (37,5)	14	0,0095
Presente	28	4 (22,2)	0 (0,0)	7	
Índice mitótico					
Baixo (<1.1)	20	10 (50,0)	6 (30,0)	12	0,059
Alto (≥1.1)	14	4 (28,6)	0 (0,0)	7	
Índice de Ki-67					
Baixo (<35.5)	20	10 (50,0)	6 (30,0)	12	0,12
Alto (≥35.5)	14	4 (28,6)	0 (0,0)	7	
Caderina E					
Preservada	12	6 (50,0)	3 (25,0)	12	0,23
Diminuída	22	8 (36,4)	3 (13,6)	10	
β-Catenina					
Preservada	11	4 (36,4)	2 (18,2)	12	0,90
Diminuída	23	10 (43,5)	4 (17,4)	12	
MMP1					
Baixo	9	5 (55,6)	3 (33,3)	19	0,28
Alto	25	9 (36,0)	3 (12,0)	11	
MMP2					
Baixo	5	3 (60,0)	2 (40,0)	31	0,29
Alto	29	11 (37,9)	4 (13,8)	12	
TIMP1					
Baixo	17	8 (47,1)	4 (23,5)	12	0,39
Alto	17	6 (35,3)	2 (11,8)	11	
VEGF					
<3	9	5 (55,6)	3 (33,3)	14	0,45
≥3	25	9 (36,0)	3 (12,0)	12	
HER-2/neu					
Negativo	23	10 (43,5)	5 (21,7)	12	0,14
Positivo	5	2 (40,0)	1 (20,0)	7	



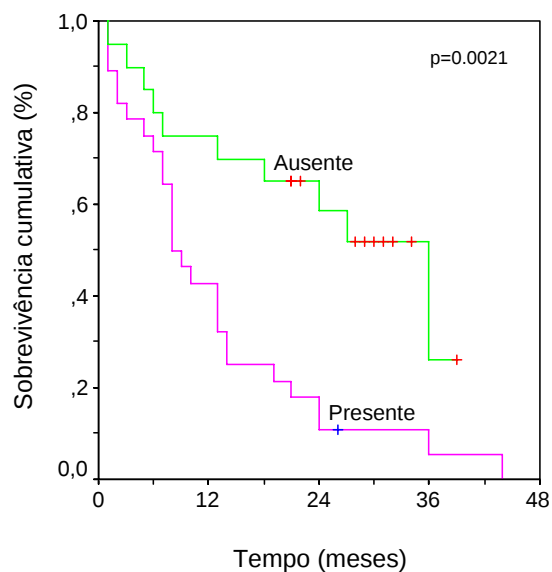


Fig. 9. Associação da sobrevivência total com a permeação vascular em gatas N_0 .

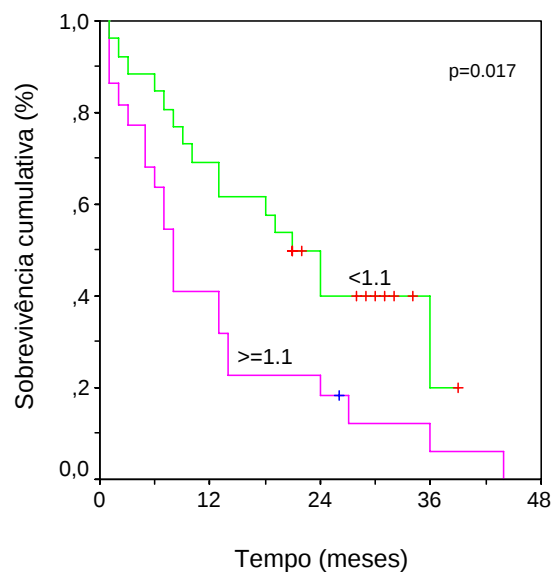


Fig. 10. Associação da sobrevivência total com o índice mitótico em gatas N_0 .

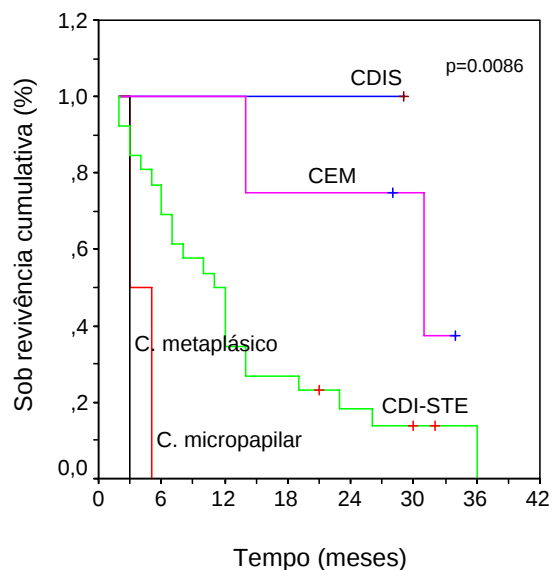


Fig. 11. Associação da sobrevivência livre de doença com o tipo histológico em gatas N_0 .

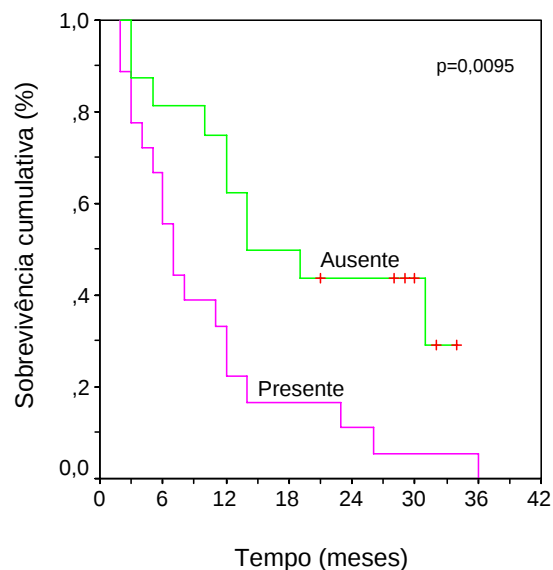


Fig. 12. Associação da sobrevivência livre de doença com a permeação vascular em gatas N_0 .

ANEXO IX

Quadro 1. Associação da ploidia de ADN e os critérios clínico-patológicos e imunohistoquímicos.

Variáveis	Ploidia de ADN			p
	ADN diplóide n (%)	ADN aneuplóide n (%)	ADN multiplóide n (%)	
Tamanho (cm)				
<2 cm	14 (45,2)	10 (29,4)	6 (21,4)	0,30
2-3 cm	11 (35,5)	12 (35,3)	13 (46,4)	
>3 cm	6 (19,4)	12 (35,3)	9 (32,1)	
Ulceração				
Ausente	24 (77,4)	22 (64,7)	18 (64,3)	0,45
Presente	7 (22,6)	12 (35,3)	10 (35,7)	
Tipo histológico				
CDIS	1 (3,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,72
CEM	4 (12,9)	2 (5,9)	1 (3,6)	
CDI-STE	21 (67,7)	24 (70,6)	20 (71,4)	
C. metaplásico	3 (9,7)	4 (11,8)	5 (17,9)	
C micropapilar	2 (6,5)	4 (11,8)	2 (7,1)	
Grau histológico (n=92)				
Grau I	2 (6,7)	3 (8,8)	0 (0,0)	0,002
Grau II	21 (71,0)	15 (44,1)	7 (25,0)	
Grau III	7 (23,3)	16 (47,1)	21 (75,0)	
Grau nuclear				
Grau 2	22 (71,0)	14 (41,2)	4 (14,3)	<0,0001
Grau 3	9 (29,0)	20 (58,8)	24 (85,7)	
Estadio				
I	12 (38,7)	10 (29,4)	5 (17,9)	0,48
II	8 (25,8)	8 (23,5)	9 (32,1)	
III/IV	11 (35,5)	16 (47,1)	14 (50,0)	
Necrose				
Ausente	2 (6,5)	2 (5,9)	0 (0,0)	0,045
Células isoladas	6 (19,4)	2 (5,9)	0 (0,0)	
Extensa	23 (74,2)	30 (88,2)	28 (100,0)	
Invasão				
Ausente	2 (6,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,20
Estroma	19 (61,3)	24 (70,6)	15 (53,6)	
Muscular	10 (32,3)	10 (29,4)	13 (46,4)	
Padrão de crescimento				
Expansivo	12 (38,7)	12 (35,3)	9 (32,1)	0,87
Infiltrativo	19 (61,3)	22 (64,7)	19 (67,9)	
Permeação vascular				
Ausente	12 (38,7)	12 (35,3)	5 (17,9)	0,18
Presente	19 (61,3)	22 (64,7)	23 (82,1)	
Metastização				
Ausente	25 (80,6)	27 (79,4)	19 (67,9)	0,45
Presente	6 (19,4)	7 (20,6)	9 (32,1)	
Diferenciação epidermóide				
Ausente	10 (32,2)	10 (29,4)	7 (25,0)	0,83
Presente	21 (67,7)	24 (70,6)	21 (75,0)	
Caderina E				
Preservada	14 (45,2)	10 (29,4)	3 (10,7)	0,014
Diminuída	17 (54,8)	24 (70,6)	25 (89,3)	
β-Catenina				
Preservada	11 (35,5)	12 (35,3)	7 (25,0)	0,622
Diminuída	20 (64,5)	22 (64,7)	21 (75,0)	

Quadro 1. (continuação) Associação da ploidia de ADN e os critérios clínico-patológicos e imunohistoquímicos.

Variáveis	Ploidia de ADN			p
	ADN diplóide n (%)	ADN aneuplóide n (%)	ADN multiplóide n (%)	
MMP1				
Baixo	12 (38,7)	11 (32,4)	4 (14,3)	0,1
Alto	19 (61,3)	23 (67,6)	24 (85,7)	
MMP2				
Baixo	6 (19,4)	5 (14,7)	3 (10,7)	0,65
Alto	25 (80,6)	29 (85,3)	25 (89,3)	
TIMP1				
Baixo	16 (51,6)	20 (58,8)	13 (46,4)	0,62
Alto	15 (48,4)	14 (41,2)	15 (53,6)	
VEGF				
<3	7 (22,6)	8 (23,5)	4 (14,3)	0,63
≥3	24 (77,4)	26 (76,5)	24 (85,7)	

Quadro 2. Associação da ploidia de ADN e a proliferação celular.

Índices proliferativos	Ploidia de ADN			p
	ADN diplóide	ADN aneuplóide	ADN multiplóide	
Índice mitótico (%)				
Mediana	0,91	1,07	1,40	0,018
Mínimo-Máximo	0,1-3,45	0,19-3,69	0,28-4,56	
Índice Ki-67 (%)				
Mediana	36,38	36,20	41,90	0,27
Mínimo-Máximo	2,2-72,27	8,25-69,40	19,4-77,70	

Quadro 3. Associação da fracção 5cER e os critérios clínico-patológicos e imunohistoquímicos.

Variáveis	5cER			p
	0 n (%)	<1 n (%)	>1 n (%)	
Tamanho (cm)				
<2 cm	10 (76,9)	2 (15,4)	18 (26,9)	0,005
2-3 cm	2 (15,4)	7 (53,8)	27 (40,3)	
>3 cm	1 (7,7)	4 (30,8)	22 (32,8)	
Ulceração				
Ausente	11 (84,6)	10 (76,9)	43 (64,2)	0,28
Presente	2 (15,4)	3 (23,1)	24 (35,8)	
Tipo histológico				
CDIS	1 (7,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,036
CEM	3 (23,1)	1 (7,7)	3 (4,5)	
CDI-STE	7 (53,8)	11 (84,6)	47 (70,1)	
C. metaplásico	0 (0,0)	1 (7,7)	11 (16,4)	
C micropapilar	2 (15,4)	0 (0,0)	6 (9,0)	
Grau histológico (n=92)				
Grau I	2 (16,7)	0 (0,0)	3 (4,5)	0,001
Grau II	7 (58,3)	12 (92,3)	24 (35,8)	
Grau III	3 (25,0)	1 (7,7)	40 (59,7)	
Grau nuclear				
Grau 2	9 (69,2)	12 (92,3)	19 (28,4)	<0,0001
Grau 3	4 (30,8)	1 (7,7)	48 (71,6)	
Estadio				
I	9 (69,2)	2 (15,4)	16 (23,9)	0,005
II	0 (0,0)	6 (46,2)	19 (28,4)	
III/IV	4 (30,8)	5 (38,5)	32 (47,8)	

Quadro 3 (continuação). Associação da fracção 5cER e os critérios clínico-patológicos e imunohistoquímicos.

Variáveis	5cER			p
	0 n (%)	<1 n (%)	>1 n (%)	
Necrose				
Ausente	2 (15,4)	0 (0,0)	2 (3,0)	0,002
Células isoladas	4 (30,8)	2 (15,4)	2 (3,0)	
Extensa	7 (53,8)	11 (84,6)	63 (94,0)	
Invasão				
Ausente	2 (15,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,002
Estroma	10 (76,9)	9 (69,2)	39 (58,2)	
Muscular	1 (7,7)	4 (30,8)	28 (41,8)	
Padrão de crescimento				
Expansivo	5 (38,5)	4 (30,8)	24 (35,8)	0,91
Infiltrativo	8 (61,5)	9 (69,2)	43 (64,2)	
Permeação vascular				
Ausente	8 (61,5)	4 (30,8)	17 (25,4)	0,036
Presente	5 (38,5)	9 (69,2)	50 (74,6)	
Metastização				
Ausente	10 (76,9)	11 (84,6)	50 (74,6)	0,74
Presente	3 (23,1)	2 (15,4)	17 (25,4)	
Diferenciação epidermóide				
Ausente	5 (38,5)	5 (38,5)	17 (25,4)	0,46
Presente	8 (61,5)	8 (61,5)	50 (74,6)	
Caderina E				
Preservada	6 (46,2)	7 (53,8)	53 (79,1)	0,019
Diminuída	7 (53,8)	6 (46,2)	14 (20,9)	
β-Catenina				
Preservada	9 (69,2)	7 (53,8)	47 (70,1)	0,51
Diminuída	4 (30,8)	6 (46,2)	20 (29,9)	
MMP1				
Baixo	6 (46,2)	4 (30,8)	17 (25,4)	0,32
Alto	7 (53,8)	9 (69,2)	50 (74,6)	
MMP2				
Baixo	4 (30,8)	2 (15,4)	8 (11,9)	0,22
Alto	9 (69,2)	11 (84,6)	59 (88,1)	
TIMP1				
Baixo	10 (76,9)	5 (38,5)	34 (50,7)	0,12
Alto	3 (23,1)	8 (61,5)	33 (49,3)	
VEGF				
<3	3 (23,1)	5 (38,5)	11 (16,4)	0,19
≥3	10 (76,9)	8 (61,5)	56 (83,6)	

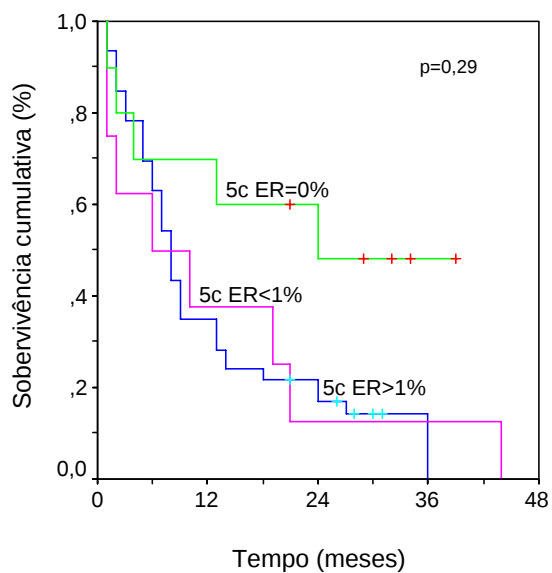


Fig. 1. Associação da fracção 5cER com a sobrevivência total.

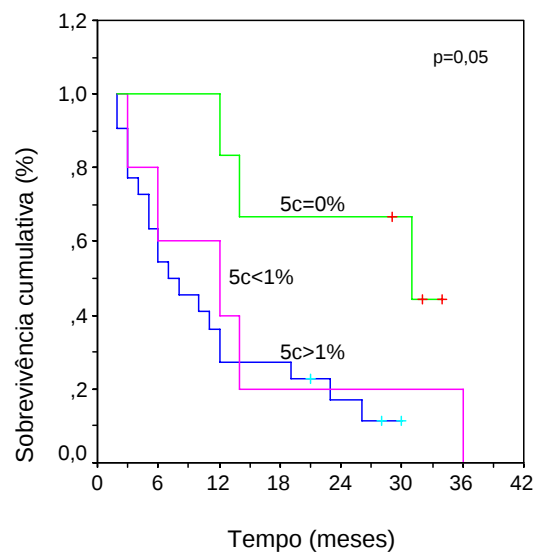


Fig. 2. Associação da sobrevivência livre de doença com a fracção 5cER em gatas N₀.

