

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR KI67 COMO
FATOR PROGNÓSTICO EM CADELAS COM NEOPLASIAS
MAMÁRIAS DOS HISTOTIPOS CARCINOMAS PAPILARES E
TUBULARES**

MURILO SOARES DE SÁ

VILA VELHA
MARÇO / 2023

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR KI67
COMO FATOR PROGNÓSTICO EM CADELAS COM
NEOPLASIAS MAMÁRIAS DOS HISTOTIPOS CARCINOMAS
PAPILARES E TUBULARES**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, para a obtenção grau de Mestre em Ciência Animal.

MURILO SOARES DE SÁ

VILA VELHA
MARÇO / 2023

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

S111a Sá, Murilo Soares de.
Avaliação do índice de proliferação celular ki67 como fator prognóstico em cadelas com neoplasias mamárias dos histotipos carcinomas papilares e tubulares / Murilo Soares de Sá – 2024.
40 f. : il.

Orientador: Igor Luiz Salardani Senhorello.
Dissertação (mestrado em Ciência Animal) - Universidade Vila Velha, 2024.
Inclui bibliografias.

1. Medicina veterinária. 2. Câncer. 3. Cachorro.
I. Senhorello, Igor Luiz Salardani. II. Universidade Vila Velha.
III. Título.

CDD 636.89

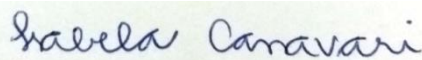
MURILO SOARES DE SÁ

**AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR KI67
COMO FATOR PROGNÓSTICO EM CADELAS COM
NEOPLASIAS MAMÁRIAS DOS HISTOTIPOS CARCINOMAS
PAPILARES E TUBULARES**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, para a obtenção grau de Mestre (a) em Ciência Animal.

Aprovada em 06 de março de 2023,


Banca Examinadora:



Prof^a. Dr^a. Isabela Cristina Canavari (FCAV-UNESP Jaboticabal)



Prof^a. Dr^a Juliana de Oliveira Ribeiro (VFP-Hospital Veterinário)



Prof. Dr. Igor Luiz Salardani Senhorello (UVV)

Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente meus pais, Inaldo de Oliveira Soares e Jurassiara Fonseca de Sá por sempre fornecerem acolhimento e me apoiarem em toda essa jornada.

Ao meu irmão, Felipe por carregar desde sempre a palavra irmão na nossa relação, se mantendo sempre presente em todos os momentos.

A Cecília, por sempre me apoiar nos meus desejos e ambições profissionais e pessoais.

A toda equipe Amicão, que está caminhando comigo por tantos anos.

A todos familiares e amigos próximos, por todo companheirismo.

Ao meu orientador, Igor Luiz Salardani Senhorello pelo conhecimento compartilhado e paciência em sempre ensinar.

A todos, que de uma forma geral participaram direta e indiretamente dessa conquista.

A Deus, por simplesmente estar me acompanhando e abençoando dia após dia.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT	vii
1. Introdução	8
2. Revisão de literatura	10
2.1 Neoplasia mamária	10
2.2 Biomarcador Ki67	12
3. Material e Métodos	16
3.1 Comitê de Ética	16
3.2 Amostragem do material	16
3.3 Imuno-histoquímica	17
3.4 Análise estatística	17
4. Resultados	19
5. Discussão	26
6. Conclusão	30
Referência Bibliográficas	31

RESUMO

SÁ, Murilo Soares, M.Sc., Universidade Vila Velha – ES, março de 2023. **Avaliação do índice de proliferação celular ki67 como fator prognóstico em cadelas com neoplasias mamárias dos histotipos carcinomas papilares e tubulares.** Orientador: Igor Luiz Salardani Senhorello.

Os tumores mamários são as neoplasias mais prevalentes em cadelas, portanto, representam um problema clínico significativo. O Ki67 é o biomarcador mais estudado para proliferação tumoral e é encontrado em muitos tipos de tumores. Esse estudo objetivou demonstrar a eficiência do marcador imuno-histoquímico Ki67 como um índice fidedigno para estabelecer prognóstico mediante comparação de sobrevida de cadelas acometidas por carcinomas mamários simples dos histotipos papilares e tubulares, além de comparar suas expressões em diferentes situações clínico-patológicas. Para isso, as amostras de tecidos mamários foram divididas em três grupos experimentais; G1 (adenomas tubulares), G2 (carcinomas simples sem metástase) e G3 (carcinomas simples com metástase em linfonodos). Os tecidos foram submetidos imuno-histoquímica com o anticorpo MIB-1 (Dako®) e as expressões de Ki67 foram comparadas entre os grupos, nas diferentes variáveis clínico-patológicas e em relação a sobrevida global para diferentes pontos de corte de Ki67. Foram utilizados os testes estatísticos de Tukey e curva de Kaplan-Meier pelo programa GraphPad Prisma 8.1 adotando um nível de significância de 5%. Foi observado que os tumores menores que 3 centímetros (69,2%) foram a maioria, sendo o histotipo papilar o mais prevalente (53,8%), o grau histológico I (29%) foi o predominante e o índice mitótico variou principalmente de 0-9 (66%). Com relação a expressão de Ki67 observou-se que carcinomas simples expressaram maiores marcações de Ki67 se comparado aos adenomas simples ($P < 0,05$), alta expressão de Ki67 com pontos de corte de 27% ($p = 0,048$) e 33% ($p = 0,025$) correlacionam significativamente com o menor tempo de sobrevida global das cadelas, além de que maiores porcentagens de marcação de Ki67 foram observados em tumores de alto grau, maiores do que 3 centímetros e com índice mitótico elevado. Portanto, o Ki67 pode ser usado como ferramenta para indicar o prognóstico e tomada de decisão terapêutica em cães com esses subtipos histológicos levando em consideração pontos de corte acima de 27% de expressão. Ademais, observou aumento do marcador na presença de fatores prognósticos desfavoráveis.

Palavras-chave: tumor mamário, carcinoma, biomarcador, sobrevida

ABSTRACT

SÁ, Murilo Soares, M.Sc., Universidade Vila Velha – ES. March, 2023.
Evaluation of the advanced cellular ki67 index as a prognostic factor in bitches with mammary neoplasms of the histotype papillary and tubular carcinomas. Advisor: Igor Luiz Salardani Senhorello.

Mammary tumors are the most prevalent neoplasms in bitches, therefore, they represent a significant clinical problem. Ki67 is the most studied biomarker for tumor apoptosis and is found in many types of tumors. This study aimed to demonstrate the efficiency of the Ki67 immunohistochemical marker as a reliable index to establish prognosis by comparing the survival of bitches affected by simple mammary carcinomas of the papillary and tubular histotypes, in addition to comparing their expressions in different clinicopathological situations. For this, mammary tissue samples were divided into three experimental groups; G1 (tubular adenomas), G2 (simple carcinomas without metastasis) and G3 (simple carcinomas with metastasis in lymph nodes). Tissues underwent immunohistochemistry with MIB-1 antibody (Dako®) and Ki67 expressions were compared between groups, in different clinicopathological variables and in relation to overall survival for different Ki67 cutoff points. Tukey's statistical tests and the Kaplan-Meier curve were used using the GraphPad Prisma 8.1 program, adopting a significance level of 5%. It was observed that tumors smaller than 3 cm (69.2%) were the majority, with papillary histotype being the most prevalent (53.8%), histological grade I (29%) predominating and the mitotic index varied mainly from 0-9 (66%). Regarding Ki67 expression, it was observed that simple carcinomas express higher Ki67 markings compared to simple adenomas ($P < 0.05$), high expression of Ki67, with cutoff points of 27% ($p = 0.048$) and 33% ($p = 0.025$) significantly correlated with the shorter overall survival time of the bitches, in addition to the fact that higher percentages of Ki67 marking were observed in high-grade tumors, larger than 3 centimeters and with a high mitotic index. Therefore, Ki67 can be used as a tool to indicate prognosis and therapeutic decision-making in dogs with these histological subtypes, taking into account cutoff points above 27% of Ki67 expression. In addition, it observed an increase in the marker in the presence of unfavorable prognostic factors.

Keywords: mammary tumor, carcinoma, biomarker, survival

1. INTRODUÇÃO

Com o aumento da expectativa de vida tanto em seres humanos como em cães, a incidência de câncer também aumentou (KASZAK et al., 2018). Os tumores mamários são as neoplasias mais prevalentes em cadelas, portanto, representam um problema clínico significativo (LANA et al., 2007). Dentre os tumores mamários caninos, aproximadamente 50% são malignos com padrão de crescimento destrutivo e infiltrativo, levando a recorrência, metástase e morte. O tipo de tumor mais comum entre eles é carcinoma tubular (adenocarcinoma), seguido de carcinoma papilar, carcinoma sólido, carcinoma complexo e carcinossarcoma (SORENMO et al., 2013; CASSALI et al., 2020). Os tumores mamários benignos são principalmente fibroadenomas, papilomas ductais, tumores mistos benignos e adenomas simples (KASZAK et al., 2018).

É comum encontrar mais de um tipo de tumor em diferentes glândulas mamárias do mesmo paciente (KASZAK et al., 2018). A ampla possibilidade de comportamentos e tipos histológicos dos tumores mamários contribui para o desafio clínico de estabelecer um prognóstico fidedigno, sobretudo quando somados a fatores predisponentes que dependem das características individuais de cada animal, sendo eles: idade, exposição prévia a hormônios exógenos, raça e peso (SORENMO et al., 2013).

No que se referem às características tumorais, vários estudos relacionam o tamanho do tumor, tipo e grau histológico, como pleomorfismo celular, índice mitótico, presença de áreas necróticas, invasão peritumoral e linfática, além de metástase de linfonodos regionais, evolução clínica e presença de metástases a distância como determinantes no planejamento terapêutico a ser instituído (GOLDSCHMIDT et al., 2011; SENHORELLO et al., 2020).

Na medicina humana já é rotineiro o uso de biomarcadores moleculares no câncer de mama com finalidade prognóstica (PAYNE et al., 2008). Os biomarcadores são geralmente proteínas que podem ser medidas no sangue ou em outros tecidos (por exemplo, em tecido tumoral) e podem dar informações sobre a presença de uma doença, resultados do tratamento ou prognóstico

adicional para o paciente (KASZAK et al., 2018). Na medicina veterinária um dos biomarcadores mais estudados são os de proliferação como o Ki67 (KASZAK et al., 2018).

O Ki67 consiste em uma proteína nuclear não histona expressa em todas as fases do ciclo celular, exceto durante a fase G0 onde se torna indetectável (KASZAK et al., 2018), e devido a essa característica é considerado uma forma mais precisa para determinar o índice proliferativo quando comparado com o método de contagem mitótica realizado na histologia simples que marca apenas as células em mitose (PEÑA et al., 1998; CASSALI et al., 2020).

Muitos estudos têm associado um maior índice de Ki67 com um pior prognóstico e menor sobrevida, assim como tem sido associado com os tumores de pior características; maior tamanho, presença de metástase em linfonodos regionais, ulceração e inflamação das glândulas (CARVALHO et al., 2016), e em sua maioria o objeto de estudo foram neoplasias mamárias complexas e histologicamente mais agressivas e não existem estudos individualizando os subtipos histológicos simples quanto ao comportamento do Ki67 (SANTOS et al., 2013; KADTHUR et al., 2011).

Esse estudo objetivou demonstrar a eficiência do marcador imunohistoquímico Ki67 como um índice fidedigno para estabelecer prognóstico mediante comparação de sobrevida de cadelas acometidas por carcinomas mamários simples dos histotipos papilares e tubulares em diferentes pontos de cortes, além de comparar as expressões desse marcador com as variáveis clínico-patológicas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Neoplasia mamária*

Os tumores da glândula mamária em cadelas são de grande importância na medicina veterinária, sendo estes os tumores que mais ocorrem em cadelas e aproximadamente 50 a 85% são malignos (NUNES et al., 2018; OLIVEIRA FILHO et al., 2010). Atualmente, há grande interesse nos tumores mamários caninos, tanto do ponto de vista prognóstico quanto terapêutico e do ponto de vista patogênico, além de ser uma base estudo como ferramenta de oncologia comparativa para os humanos (FOSTER, 2009).

A causa dos tumores mamários em cadelas é multifatorial, fatores de risco hormonais foram descritos, além de fatores nutricionais e a própria predisposição genética (BEAUVAIS et al., 2012). Os hormônios (endógenos e exógenos) têm a capacidade de estimular a proliferação celular e isso leva as alterações genéticas que por fim, favorecem a carcinogênese (HENDERSON, FEIGELSON, 2000). De fato, os hormônios sexuais estão entre os principais fatores de risco para o câncer, com a exposição da mama aos hormônios ovarianos, como estrogênio e progesterona, aumenta significativamente a possibilidade de câncer (DAVIDSON e STABENFELDT, 2014). Além disso, a administração de alguns progestágenos, incluindo Acetato de Medroxiprogesterona, Acetato de Megestrol e Acetato de Cloromadinona, podem aumentar o risco de desenvolvimento de tumores mamários (MORRIS e DOBSON, 2007).

Ademais, a idade é um fator de risco significativo para o desenvolvimento de tumores mamários em cadelas (SORENMO et al., 2013). Uma maior incidência é observada em cães de meia-idade e mais velhos, incluindo a faixa etária de 8 a 10 anos (STRATMANN et al., 2008; SORENMO et al., 2013).

O diagnóstico é baseado na anamnese e no exame físico, o principal indício clínico observado é o aumento de volume nas mamas (DE NARDI et al., 2009). A citologia aspirativa pode ser usada para diagnosticar o tumor, mas é frequentemente usada para detectar metástases em linfonodos regionais e diferenciar neoplasias mamárias de cutâneas (CASSALI et al., 2017). No

entanto, o exame histopatológico é o método de confirmação para as neoplasias mamárias (DALECK, 2016). E o estadiamento dos tumores mamários visa avaliar o tamanho do tumor, o acometimento de linfonodos regionais e a existência de metástases à distância, o que permite determinar o prognóstico da doença e planejar o tratamento (CASSALI et al., 2014).

A maioria das neoplasias da glândula mamária é de origem epitelial. No entanto, existem tipos histológicos mistos que consistem em tecido epitelial e mioepitelial com áreas de cartilagem e osso, e alguns tumores são de origem estritamente mesenquimal (MEDEIROS, 2017). Os tumores epiteliais são muitas vezes classificados de acordo com sua extensão histopatológica e heterogeneidade (MEDEIROS, 2017).

Os carcinomas mamários são as neoplasias mais comuns em cadelas e frequentemente se tornam fatais devido ao desenvolvimento de metástases (SILVA, 2018). As metástases para os linfonodos regionais representam o primeiro passo no processo metastático e um dos mais importantes fatores prognósticos do carcinoma mamário em cadelas e em humanos (FITZGIBBONS et al, 2000). O comprometimento linfonodal é frequentemente seguido do desenvolvimento de metástases à distância, principalmente no pulmão, o que gera um desfecho fatal para a doença, podendo acometer fígado, baço, ossos e adrenais (SILVA, 2018).

Os carcinomas simples foram encontrados com a maior frequência de ocorrência em diversos estudos (OLIVEIRA FILHO et al., 2010; TAVASOLY et al., 2013; YOSHIDA et al., 2014). No estudo retrospectivo conduzido por OLIVEIRA FILHO e colaboradores (2010) o carcinoma simples foi o tipo histológico mais prevalente tanto em biópsias (29,1%) quanto em necropsias (41,45%), sendo o carcinoma túbulo-papilar mais prevalente também em biópsias (23,28%) e necropsias (31,58%). Da mesma forma que TAVASOLY e colaboradores (2013) também observaram em um estudo retrospectivo, o carcinoma simples 56,8% como tipo de tumor mais frequentemente, assim como, destes 80,9% eram subclassificados como carcinoma túbulo-papilar. Além disso, vários autores relataram que os carcinomas simples são mais agressivos e têm

um prognóstico pior do que os carcinomas complexos (CASSALI et al., 2012; CASSALI et al., 2014).

O tratamento da maioria das neoplasias mamárias é a remoção cirúrgica completa, pois permite o diagnóstico histológico, podendo inclusive ser curativo (CIRILLO, 2008). Já a quimioterapia é indicada no tratamento de doenças sistêmicas ou metastáticas, devendo ser aplicada aos tumores mamários como terapia adjuvante, que, juntamente com a cirurgia, visa tentar a cura do animal (DE NARDI et al, 2008). Por fim, observou-se que os pacientes submetidos a esses procedimentos têm melhor qualidade de vida e podem até alterar o avanço da doença (DE NARDI et al, 2008, CIRILLO, 2008).

2.2 Biomarcador Ki67

A apresentação, o comportamento clínico, a morfologia e as características biológicas da neoplasia mamária em cadelas são extremamente mutáveis, sendo um dos maiores desafios prever e prognosticar o curso clínico da patologia e o melhor regime terapêutico a aplicar (HICKS, KULKARNI, 2008; RAKHA, ELLIS, 2009).

As células em resposta à carcinogênese apresentam moléculas, que podem estar presentes no sangue ou em outros fluidos biológicos, que refletem a atividade da neoplasia (HENRY e HAYES, 2012). Porém, os tumores de mama diferem morfológica e biologicamente, isso dificulta a seleção de marcadores tumorais adequados para o diagnóstico (KASZAK et al., 2018).

O Ki67 é o biomarcador mais estudado para proliferação e apoptose tumoral canina e é encontrado em muitos tipos de tumores (KASZAK et al., 2018). Em tumores de mama, este é o biomarcador preditivo mais utilizado (KASZAK et al., 2018, NUNES et al., 2018). O Ki67 é uma proteína nucleolar não histona codificada por gene MKI-67 e só pode ser detectada no núcleo da célula durante a interfase e a mitose (KASZAK et al., 2018). O Ki67 se move para a superfície do cromossomo e assim, pode ser detectado já na fase G1 do ciclo celular e aumenta nas fases S e G2 (KASZAK et al., 2018). Tem a mais alta expressão na fase M, e sua expressão desaparece rapidamente após a mitose, sendo que já na fase G0 é indetectável (TOKUDA et al., 2017; KASZAK et al.,

2018, UXA et al., 2021). Portanto, a expressão de Ki67 indica o estado da proliferação celular. De fato, Ki67 é altamente expresso em células cancerígenas e tem sido proposto como um marcador prognóstico de câncer (MENON et al., 2019; YANG et al., 2017).

O Ki67 funciona como um surfactante que permite a motilidade cromossômica e sua interação com fuso mitótico, impedindo assim o colapso do cromossoma em massa de cromatina após a desmontagem do envelope nuclear (MENON et al., 2019). Além disso, o Ki67 tem papéis na transcrição do RNA e na compactação e organização da heterocromatina possivelmente por complexos de metilação de histonas necessários para a manutenção da heterocromatina (MENON et al., 2019). Esses recursos durante a biogênese do ribossomo podem possivelmente explicar a ligação entre a proliferação celular e expressão de Ki67 (MENON et al., 2019).

Este biomarcador está positivamente correlacionado com a progressão do câncer e, portanto, pode ser também um indicador de prognóstico (TOKUDA et al., 2017). Não apenas é um biomarcador sérico, mas também celular e técnicas como imuno-histoquímica, Western blotting, e SDS-PAGE já foram testadas e podem ser colocadas para mensurar sua expressão (NOWAK et al., 2007; TOKUDA et al., 2017, THEJASWINI et al., 2022). Sua importância está na determinação do índice mitótico já que para a coloração de rotina em histologia como hematoxilina e eosina não é tão precisa quanto a coloração imuno-histoquímica com Ki67 (NOWAK et al., 2007; TOKUDA et al., 2017). Além disso, pode ser avaliada em amostras citológicas de biópsia por agulha fina da glândula mamária canina, o que gera uma opção para o diagnóstico precoce do tumor (CHOI et al., 2011).

Um estudo foi realizado para avaliar seu valor como biomarcador sérico, utilizando um kit ELISA específico para cães para sua determinação (NEUMANN et al., 2017). O Ki67 foi indetectável no soro de cães saudáveis, enquanto os níveis séricos em cães portadores de tumor correlacionaram-se positivamente com o grau do tumor (NOWAK et al., 2007). Os níveis de Ki-67 na coloração imuno-histoquímica foram significativamente menores em tumores de mama benignos do que malignos, e valores altos foram associados positivamente com

metástase, mau prognóstico e baixa sobrevida em cães (GIZINSKI et al., 2003; NOWAK et al., 2015). A expressão do Ki67 é maior em tumores com avaliação clínica e histopatológica ruim, características como tumor de tamanho grande, inflamação e ulceração da glândula mamária, invasão de tecidos circundantes e metástases linfonodais (GIZINSKI et al., 2003; NOWAK et al., 2015).

Um estudo conduzido com diversos tipos histológicos de tumores mamários em cadelas, o maior índice foi observado em tumor mamário misto maligno e a expressão de Ki67 em tumores benignos foi significativamente menor que os tumores malignos (KRISHNA et al., 2022). Além disso, outro estudo concluiu que a expressão de Ki67 é um fator prognóstico independente em tumores mamários em cães e que evidenciou um forte valor prognóstico quando comparado aos parâmetros clínicos ou histológicos tradicionalmente usado para prever o resultado do paciente, como tamanho do tumor, grau histológico e modo de crescimento (SANTOS et al., 2013).

Segundo um estudo da expressão de ki67 nos carcinomas mamários de diferentes subtipos histológicos de cadelas, onde foi avaliado a correlação com variáveis patológicas e prognóstico, foi observado que quanto maior a expressão de Ki67 maior é a atividade proliferativa e que também obteve uma correlação com menor tempo de sobrevida em geral (BRUNETTI et al., 2020).

De acordo com o Consenso Brasileiro, o índice de proliferação deve ser determinado pela coloração de Ki67 avaliada em pelo menos 1000 células neoplásicas em campos de grande aumento (400X). Os pontos de corte de 14%, 20%, 22%, 24%, 27% e 33% já foram determinados, mas o cut-off sugerido é \geq 20% (ITO et al., 1996; LAVALLE et al., 2012; DE ARAUJO et al., 2015; CARVALHO et al., 2016; NUNES et al., 2018; CASSALI et al., 2020).

Em seu estudo KADTHUR et al. (2011), observaram que apenas 27% dos cães com valores de Ki67 inferior a 14% vieram a óbito devido à malignidade e aqueles com valores superiores tiveram prognóstico ruim. Resultados que

corroboram com os encontrados por CARVALHO et al (2016) que estabeleceram como ponte de corte valores iguais ou superiores a 22%.

Dado o importante papel do Ki67 na proliferação celular, a inibição de Ki67 pode ser considerada ao projetar novas estratégias para a terapia do câncer. Ki67 é proposto como um alvo terapêutico atraente para o câncer porque é altamente expresso na maioria das células malignas, mas raramente é detectado em células normais (YANG et al., 2017). Um estudo relatou que o oligonucleotídeo metilado direcionado ao Ki67 pode efetivamente inibir a proliferação enquanto induz a apoptose de células de carcinoma renal (LASKIN et al., 2012). Além disso, vírus oncolíticos podem se replicar seletivamente em células tumorais, levando à disseminação intratumoral do vírus (CHEN et al., 2015). Portanto, um experimento criou o adenovírus condicionalmente replicativo (ZD55- Ki67) para manter a capacidade lítica do adenovírus oncolítico porém com ação contra Ki67 e assim, induziu apoptose em células de câncer renal in vitro e inibiu a crescimento de câncer em camundongos (CHEN et al., 2015).

Portanto, este biomarcador é muito promissor; contudo, mais estudos em grupos mais homogêneos de tumores de mama em cães devem ser realizados. Isso se deve, em grande parte, à variabilidade metodológica de expressão KI67 (como tipo de anticorpo, tipo de amostra, tipo de fixador, métodos de recuperação de antígeno, método de pontuação, etc.) e limitações no desenho e análises de estudos que relataram sobre este marcador (ABUBAKAR et al., 2016). Dessa maneira, torna-se fundamental uma padronização para a definição precisa do Ki67 e a sua quantificação determina importantes informações prognósticas, além das variáveis clínico-patológicas utilizadas tradicionalmente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Comitê de Ética

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UVV, Espírito Santo, Brasil sob o protocolo nº 568-2020 e ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP-Jaboticabal (protocolo nº 016384/17). Os proprietários que aceitaram participar do projeto receberam orientação e assinaram um termo de consentimento livre esclarecido.

3.2 Amostragem do material

As amostras foram obtidas de tecidos neoplásicos em parafina de cadelas atendidas no Hospital Veterinário "Professor Ricardo Alexandre Rippler" da UVV e no Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da FCAV/UNESP Jaboticabal que passaram por mastectomia conforme estabelecido rotineiramente por cada instituição. As amostras foram provenientes do banco de dados do setor de patologia veterinária das duas instituições. Um total de 70 amostras de tecidos mamários divididos em 3 grupos foram analisadas (CASSALI et al., 2014).

- Grupo 1 (G1): 19 amostras de adenoma mamário simples.
- Grupo 2 (G2): 43 amostras de carcinomas mamários simples e não metastáticos.
- Grupo 3 (G3): 8 amostras de carcinoma mamário simples com metástase em linfonodo.

A ficha clínica dos animais selecionados foi avaliada para as seguintes informações clínico-patológicas: raça, idade, tipo histológico, tamanho do tumor, grau histológico, índice mitótico e tempo de sobrevivência global (TSG). Com relação ao grau histológico, os grupos foram divididos em grau I, II e III, seguindo a classificação histopatológica de ELSTON e ELIS (1991).

Para determinação do tempo de sobrevida global (TSG) levou em consideração o dia do diagnóstico até a data de morte. Nos casos em que o animal permanecia vivo ao final dos 3 anos (tempo mínimo de acompanhamento do último animal), estes eram classificados como censurados, as informações foram atualizadas ao final do período experimental por meio de ligações telefônicas aos tutores e registradas nos prontuários.

3.3 Imuno-histoquímica

As análises foram realizadas no laboratório de imuno-histoquímica da FACV/UNESP Jaboticabal. Para imunomarcação do Ki67 foi utilizado anticorpo monoclonal de camundongo (MIB-1, 1:100, Dako) e o protocolo foi o descrito anteriormente por SIERRA et al. (2018).

Os blocos com as amostras parafinizadas foram cortados na espessura de 3µm e estendidos em lâminas de vidro sinalizadas. As lâminas foram desparafinadas e reidratadas como realizado rotineiramente e as seções submetidas à recuperação antigênica em panela de vapor tipo *steamer* por 30 segundos a 126°C em solução tampão de citrato (pH 6) e a incubação em anticorpo primário por 2 horas em temperatura de 22°C. Para a detecção, foi utilizado um sistema comercial de detecção de polímeros (polímero Novolink DS, Leika Byosystems). As amostras foram contrastadas com hematoxilina de Harris e montadas após a desidratação em concentrações graduadas de álcool e xilol.

Para a contagem do Ki67, cinco campos em 400x de magnificação contendo áreas com maior proporção de células positivas foram fotografadas, e em cada campo foi realizada a contagem manual com o auxílio do programa ImageJ de 200 células totalizando 1000 células (De Matos, et al., 2006; Kadthur et al., 2011), desse valor foi obtida a porcentagem de células positivas.

3.4 Análise estatística

Para a análise de proporções foram elaboradas tabelas de frequência com os dados clínico-patológicos (raça, idade, grau histológico, tipo histológico, tamanho tumoral, estágio e índice mitótico). Além disso, os grupos experimentais, bem como, as variáveis clínico-patológicas foram comparados pelo método de Tukey em relação à média de expressão de Ki67.

Para análise de sobrevida foram considerados vários pontos de corte para a alta expressão do Ki67 conforme trabalhos realizados anteriormente; $\geq 14\%$ (KADTHUR et al., 2011), $\geq 20\%$ (ARAÚJO et al., 2015), $\geq 22\%$ (CARVALHO et al., 2016), $\geq 24\%$ (ITO et al., 1996) $\geq 27\%$ (LAVALLE et al., 2012) e $\geq 33\%$ (NUNES et al., 2018). Para determinar as curvas de sobrevida foi utilizada a análise de sobrevivência de Kaplan-Meier para o tempo de sobrevida global, comparadas pelo teste de Long-rank, essas também foram utilizadas para as variáveis clínico-patológicas. Foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prisma 8.1 adotando um nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

De acordo com os resultados do estudo observou-se que os animais sem raça definida (SRD) foram os mais prevalentes, com 18 animais (34,7%), seguido de Poodle e York Shire Terrier, ambos com 5 animais (9,6%). A média de idade dos cães foi de 10 anos, com intervalo entre 5 a 15 anos. A maior prevalência foi de tumores menores que 3 centímetros (69,2%) sendo o histotipo papilar o mais prevalente (53,8%). O grau histológico I (29%) foi o predominante nesse estudo e o índice mitótico variou principalmente de 0-9 (66%). Além disso, o estágio da doença foi principalmente o estágio I (67,3%), seguido do estágio IV (15,4%). As variáveis clínico-patológicas estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Variáveis clínico-patológicas observadas nos animais com carcinoma mamário simples.

Variável Clínica	No. de cães	Porcentagem	Média (intervalo)
Raça	SRD	18	34,7%
	Poodle	5	9,6%
	York Shire Terrier	5	9,6%
	Pinscher	4	7,7%
	Golden Retriever	3	5,8%
	Shih Tzu	3	5,8%
	Pit Bull	2	3,8%
	Fox Paulistinha	2	3,8%
	Lhasa Apso	2	3,8%
	Border Collie	2	3,8%
	Outros	6	11,6%
Idade (anos)			10 (5-15)
Tamanho (maior eixo)	<3 cm	36	69,2%
	≥ 3 cm	16	30,8%
Histotipo	Papilar	28	53,8%
	Tubular	24	46,2%
Grau histológico	I	29	55,8%
	II	18	34,6%

	III	5	9,6%
Índice mitótico/10 cga	0-9	40	66%
	> 9	21	34%
Estágio	I	35	67,3%
	II	5	9,6%
	III	4	7,7%
	IV	8	15,4%

SRD: Sem raça definida; <3 cm: menor do que três centímetros; ≥ 3 cm: maior ou igual a três centímetros; cga: campo de grande aumento

As variáveis clínico-patológicas sobre necrose e ulceração não foram incluídas na tabela diante da baixa frequência apresentada nesse estudo. Em relação ao índice de proliferação celular Ki67, as médias dos grupos G1, G2 e G3 foram 8,71%, 17,07% e 25,40%, respectivamente. Avaliando a expressão de Ki67 entre os grupos experimentais observou-se diferença significativa entre o G1 e G2 ($p=0,0235$) e G1 e G3 ($p=0,0023$), entretanto não houve diferença entre G2 e G3 ($p=0,1398$). Carcinomas simples e carcinomas simples com metástase em linfonodos expressaram maiores marcações de Ki67 se comparados aos adenomas simples (Figura 1).

Por conseguinte, comparando a expressão de Ki67 entre os histotipos observou-se média de marcação de 18,53% para os carcinomas papilares e 18,14% para os tubulares não havendo diferença entre eles ($p=0,9096$) (Figura 1).

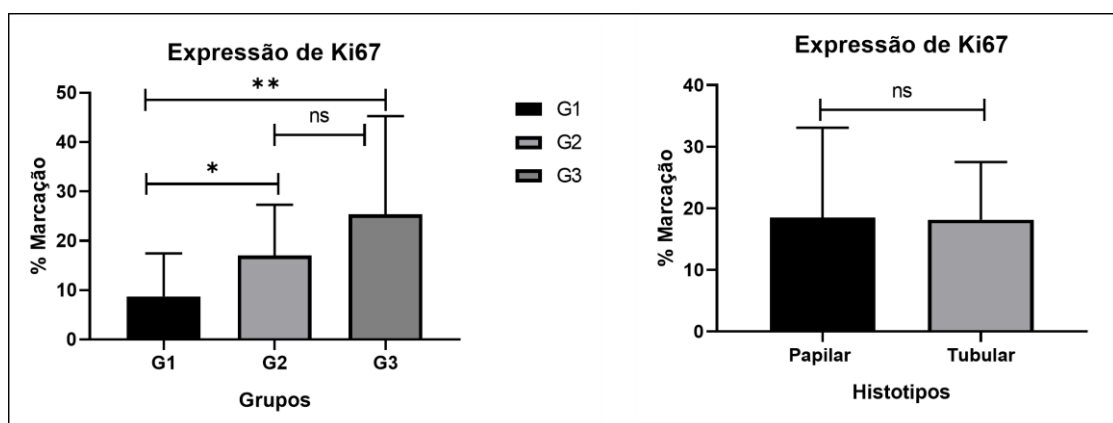


Figura 1- Representação gráfica da expressão de Ki67 nos grupos experimentais (G1, G2 e G3) e nos diferentes histotipos. O asterisco representa diferença estatística ($p<0,05$).

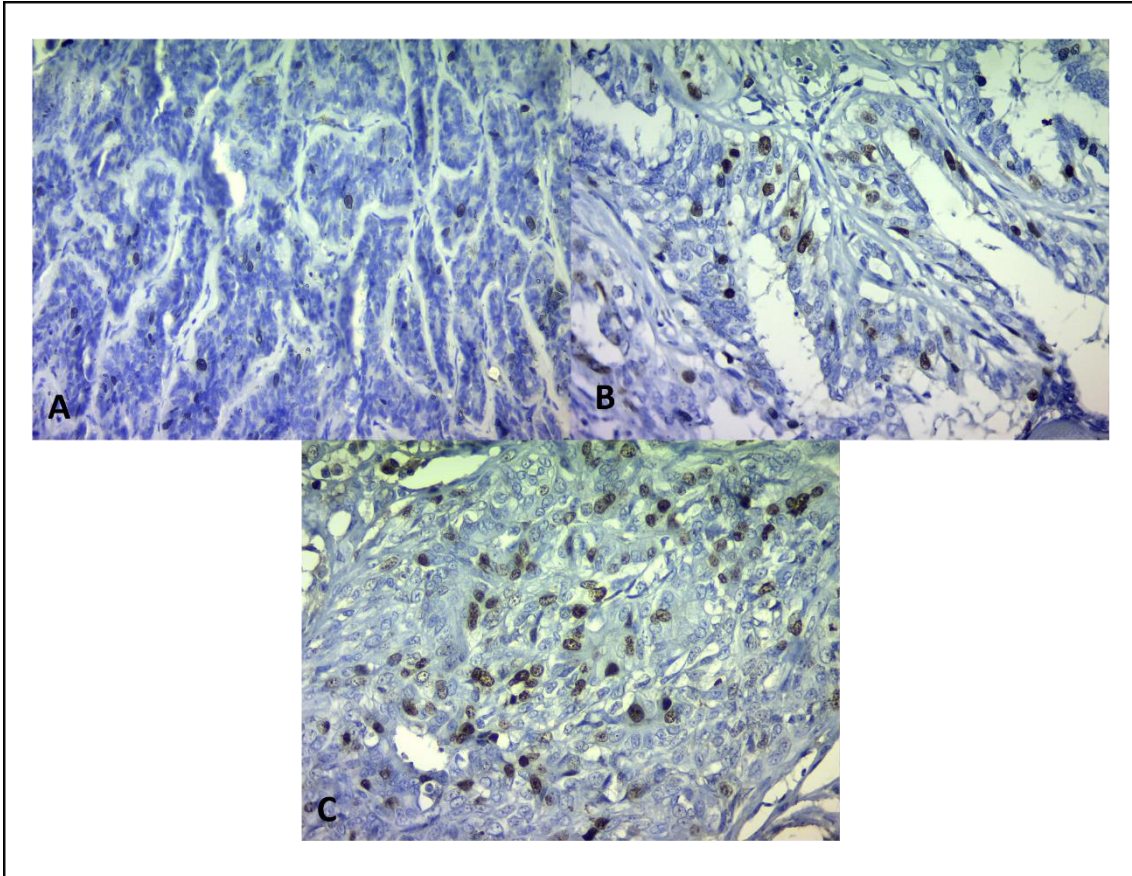


Figura 2- Fotomicrografia da marcação imuno-histoquímica nuclear de Ki67 (clone MIB-1, Dako; 1:100) em adenomas simples (A), carcinomas simples não metastáticos (B) e carcinomas simples com metástase em linfonodos (C). Magnificação de 400X, em microscópio Novel (BM2100) acoplado a câmera Bioptika (CMOS-HD).

Com relação a expressão de Ki67 e o tempo de sobrevivência global das cadelas com carcinomas mamários simples, não foram observadas diferenças significativas nos pontos de corte 14% ($p=0,1337$), 20% ($p=0,0548$), 22% ($p=0,0514$) e 24% ($p=0,0658$). Entretanto, houve diferença significativa em relação à alta expressão de Ki67 de 27% ($p=0,048$) e 33% ($p=0,025$) e o tempo de sobrevivência global das cadelas desse estudo (Figura 3).

Portanto, de acordo com os resultados na condição de alta expressão de Ki67 para os pontos de corte de $\geq 27\%$ e $\geq 33\%$ os animais tiveram uma mediana de sobrevivência global de 365 dias e 540 dias ($p=0,0048$ e $p=0,0025$), respectivamente. Além disso, 90% e 100% dos animais foram a óbito durante o

período de acompanhamento quando os tumores expressaram mais de 27% e 33% de Ki67, respectivamente. Em contraste, tumores com expressões de Ki67 com ponto de corte menor ($\geq 24\%$, $\geq 22\%$, $\geq 20\%$ e $\geq 14\%$) foram associados a medianas de sobrevida global maiores variando entre 735 dias a 870 dias e não tiveram impacto a sobrevivência dos animais ($p > 0,05$) (Tabela 2).

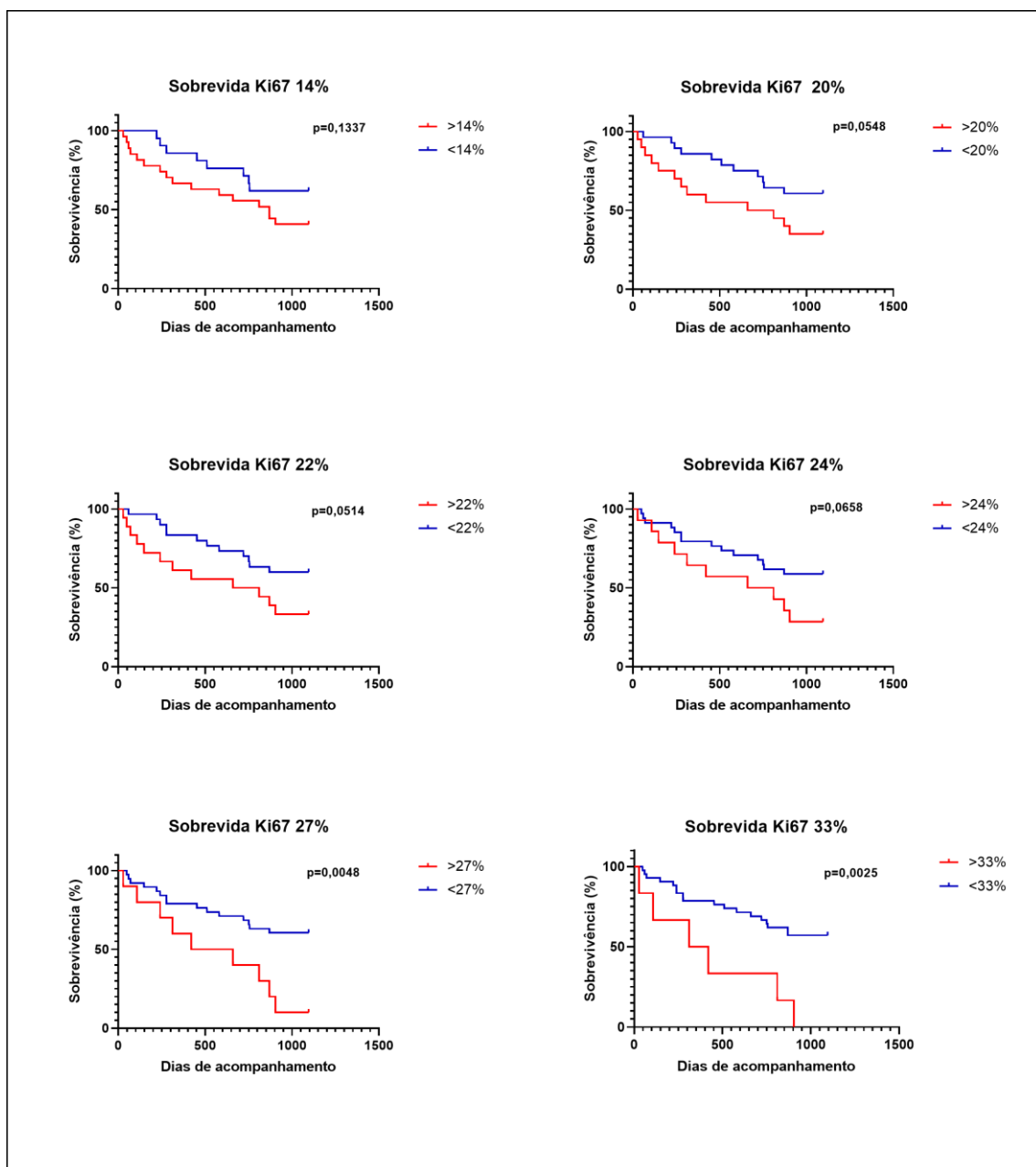


Figura 3- Análise estatística das expressões de Ki67 e tempo de sobrevida

global de cadelas portadoras de carcinomas mamários simples pelo método de Kaplan-Meier.

Tabela 2- Dados de porcentagem de sobrevivência e mediana de sobrevida dos animais com carcinoma mamário simples para os diferentes pontos de corte de ki67 analisados pelo método de Kaplan-Meier e teste de Log-rank.

Ki67 %	Sobrevivência %	Mediana (dias)	P-Valor
>14	40,70	870	0,1337
<14	61,90	Indefinido	
>20	35,00	735	0,0548
<20	60,7	Indefinido	
>22	33,30	735	0,0514
<22	60,00	Indefinido	
>24	28,60	735	0,0658
<24	58,20	Indefinido	
>27	10,00	540	0,0048*
<27	60,00	Indefinido	
>33	0,00	365	0,0025*
<33	57,1	Indefinido	

Segundo a análise de expressão de Ki67 e as variáveis-clínico patológicas observou-se que o grau histológico ($p=0,0120$), o tamanho do tumor ($p=0,0223$) e o índice mitótico ($p=0,0370$) apresentaram diferença estatística significativa em relação a expressão de Ki67. Maiores porcentagens de marcação de Ki67 foram observados em tumores de alto grau, maiores do que 3 centímetros e com índice mitótico elevado (Tabela 3).

Tabela 3- Relação entre as variáveis-clínico patológicas e a porcentagem de marcação de ki67 nas cadelas com carcinomas mamários simples.

Variáveis	N	Marcação ki67 %	P-valor	
Grau histológico	I	29	14,6	0,0120*
	II/III	23	23,1	
Tamanho	< 3 cm	36	15,8	0,0223*
	>3 cm	16	24,1	
Índice Mitótico	<9	40	16,7	0,0370*
	>9	12	23,8	

Além disso, de acordo com as análises das variáveis clínico-patológicas e o tempo de sobrevida, conforme o maior grau histológico ($p=0,0425$ e mediana

sobrevida de 705 dias), o maior tamanho do tumor ($p=0,0019$ e mediana sobrevivida de 580 dias), o maior índice mitótico ($p=0,0001$ e mediana sobrevivida de 330 dias) e a presença metástase ($p=0,048$ e mediana sobrevivida de 515,5 dias) menor o tempo de sobrevivida dos animais. Entretanto, o tipo histológico não interferiu na sobrevivida ($p>0.05$), com isso, tanto o histotipo papilar quanto o tubular obtiveram altas medianas com 983 e 999 dias, respectivamente (Figura 04 e Tabela 04).

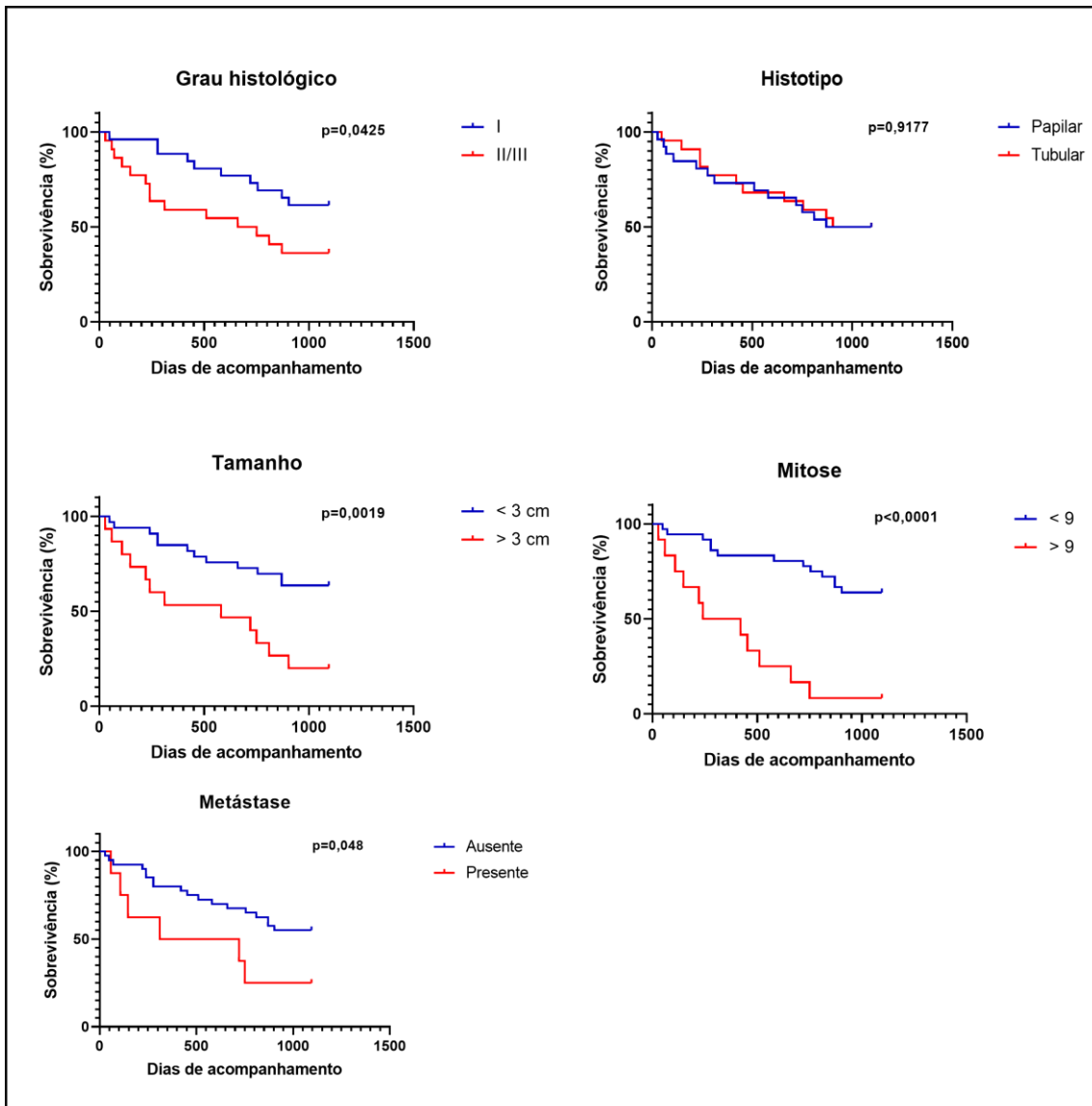


Figura 4- Análise estatística das variáveis clínico-patológicas e tempo de sobrevivida global de cadelas portadoras de carcinomas mamários simples pelo método de Kaplan-Meier.

Tabela 4- Dados de porcentagem de sobrevivência e mediana de sobrevida dos animais com carcinoma mamário simples para as variáveis clínico-patológicas pelo método de Kaplan-Meier e teste de Log-rank.

Variáveis		Sobrevivência %	Mediana (dias)	P-Valor
Grau histológico	I	61,50	Indefinido	0,0425*
	II/III	36,40	705	
Histotipo	Papilar	50,00	982,5	0,9177
	Tubular	50,00	999,5	
Tamanho	< 3 cm	63,30	Indefinido	0,0019*
	> 3 cm	20,00	580	
Mitose	< 9	63,90	Indefinido	<0,0001*
	> 9	8,30	330	
Metástase	Ausente	55,00	Indefinido	0,048*
	Presente	25,00	515,5	

5. DISCUSSÃO

As variáveis clínico-patológicas investigadas nesse estudo estão em sua grande maioria em consonância com a literatura. A idade é um fator influente nos tumores mamários, sendo que a frequência dos tumores de mama aumenta a partir dos seis anos de idade (MOULTON, 1990). De acordo com LANA et al. (2007) a média de idade para a manifestação do tumor é de 10 a 11 anos, sendo que a média da idade dos cães nesse estudo foi de 10 anos, com intervalo entre 5 a 15 anos.

Diversas raças são relatadas com maior prevalência para o desenvolvimento de tumores mamários, de acordo com o estudo os animais sem raça definida foram os mais prevalentes. A maior incidência em animais sem raça definida deve-se provavelmente ao fato de haver o predomínio de cães mestiços em nosso país (HATAKA, 2004), além de que os atendimentos do hospital veterinário universitário são um serviço com um valor mais acessível. FOSSUM (2019) cita o Poodle, Boston Terrier, Fox Terrier e Daschund como raças com maior prevalência, corroborando ao observado no presente estudo no qual observou-se cães da raça Poodle como a segunda raça mais frequente.

A maior prevalência foi de tumores menores que três centímetros, o grau histológico I, bem diferenciados e estágio de doença I, ou seja, tumor restrito a uma parte do corpo, sem comprometimento linfático ou metástase a distância. Tais resultados também corroboram com outros estudos conduzidos no Brasil em que a maior prevalência foi de tumores em estágio I ou de histopatologia mais favorável (GUNDIM et al., 2016; RÊGO et al., 2012). Portanto, esse resultado pode revelar que a posse responsável faz com que os tutores de animais hoje em dia estejam mais atentos aos sinais clínicos de mudança e doenças, além disso, a disseminação da informação sobre tumores mamários auxilia a um diagnóstico precoce.

O tipo histológico mais prevalente foi o carcinoma papilar, porém apresenta pouca diferença quando comparado ao carcinoma tubular. Os carcinomas papilares são tumores histologicamente caracterizados por uma

proliferação epitelial papilar arborescente com estroma fibrovascular central, já o carcinoma tubular é caracterizado por proliferação de células epiteliais dispostas de forma predominantemente tubular, sendo que a quantidade de estroma pode variar consideravelmente (CASSALI et al. 2011). O presente estudo somente avaliou o histotipo papilar e tubular, porém o estudo conduzido por SILVA (2018) que avaliou vários tipos histológicos observou maior prevalência do carcinoma tubular (12,4%) em comparação com o carcinoma papilar (6,2%).

Em relação ao índice de proliferação celular Ki67, foi observado um maior índice de proliferação nos grupos de tumores malignos como G3, carcinoma mamário simples com metástase em linfonodo (25,40%), seguido do grupo G2, carcinomas mamários simples e não metastáticos (17,07%), quando comparado ao grupo G1, adenoma mamário simples (8,71%). Tal fato corrobora com o estudo conduzido por RODRIGUES e colaboradores (2016) em que a porcentagem de células Ki67 positivas foi significativamente maior em tumores malignos em comparação com os benignos ($P \leq 0,001$). Da mesma forma que foi observado um aumento do índice Ki67 em tumores de diversos subtipos histológicos no estágio II, possivelmente devido ao maior número de células sob proliferação com a expressão da proteína Ki67 (KADTHUR et al., 2011).

Apesar dos resultados demonstrarem proliferação celular Ki67 maior em neoplasias malignas do que neoplasias benignas, não houve associação significativa com tipo histológico papilares/tubulares, esse mesmo resultado foi obtido por PENÃ et al. (1998), em que tumores benignos não foram discriminados de displasias nem neoplasias malignas com formações tubulares/papilares diferenciadas daquelas sem tais estruturas.

Além disso, existe uma relação positiva para expressão de Ki67 com tamanho tumoral maior, índice mitótico e grau histológico de malignidade, ou seja, de acordo com o estudo pacientes que apresentam grau histológico \geq II ($p=0,0120$), tamanho maior que três centímetros ($p=0,0223$) e índice mitótico maior que nove ($p=0,0370$) apresentam maior expressão de Ki67. Essas descobertas destacam o papel crucial do Ki67 na progressão tumoral (RODRIGUES et al., 2016). Resultados semelhantes já foram descritos, em que houve uma diferença estatística da associação de expressão do Ki67 com tamanho tumoral maior, tipo histológico, índice mitótico, grau histológico de malignidade (RODRIGUES et al., 2016). Porém em consonância com NOWAK (2016) não foi observado diferenças significativas na expressão de Ki67 entre tumores metastáticos e tumores não metastáticos. A alta expressão de Ki67 associada às variáveis clínico-patológicas reforça o papel prognóstico desse marcador tumoral em carcinomas mamários simples.

Com relação a expressão de Ki67 e o tempo de sobrevida global das cadelas com carcinomas mamários simples, não foram observadas diferenças significantes nos pontos de corte 14% ($p=0,1337$), 20% ($p=0,0548$), 22% ($p=0,0514$) e 24% ($p=0,0658$). Entretanto, houve diferença significativa em relação à alta expressão de Ki67 27% ($p=0,048$) e 33% ($p=0,025$) e o tempo de sobrevida global dos animais, com pior prognóstico. Esses resultados demonstram que animais com carcinomas simples que expressam Ki67 em mais de 27% das células têm menores chances de sobrevivência e esse dado pode ser usado em conjunto com outros fatores prognósticos para tomada de decisão da terapia adjuvante.

Este biomarcador está positivamente correlacionado com a progressão do câncer e, portanto, pode ser também um indicador de prognóstico (TOKUDA et al., 2017). De acordo com o estudo conduzido por BRUNETTI et al. (2020) no

qual foi investigado as taxas de proliferação de tumores mamários para avaliar seu impacto no prognóstico, um ponto de corte de 33,3% foi usado para distinguir tumores mamários de “alta proliferação” versus “baixa proliferação” e que esse valor de corte definiu grupos de tumores que se correlacionam diretamente com a sobrevida, corroborando aos nossos achados. Tais resultados são divergentes de KADTHUR (2011), o qual observou uma clara associação entre a morte por malignidade e o índice Ki67 usando a mediana do índice Ki67 com valor de corte de contagem de 14,27%, ou seja, índices maiores que 14,27% tinham pior prognóstico. No entanto, um ponto de corte padrão para contagens de Ki67 em tumores mamários em cadelas ainda não foi definido, visto que a maioria dos estudos utiliza uma grande variedade de tipos histológicos apresentando resultados conflitantes.

Juntamente com outros estudos, a expressão do Ki67 mostrou uma associação estatisticamente significativa com o tamanho do tumor, índice mitótico, grau histológico (RODRIGUES et al., 2016). Além disso, de acordo com as análises das variáveis clínico-patológicas e o tempo de sobrevida, conforme o maior grau histológico ($p=0,0425$), o maior tamanho do tumor ($p=0,0019$), o maior índice mitótico ($p=0,0001$) e a presença metástase ($p=0,048$) menor o tempo de sobrevida dos animais. Corroborando com GUNDIM (2016) o grau histológico se mostrou um parâmetro fidedigno para a avaliação prognóstica dos carcinomas mamários. Da mesma forma que o diâmetro do tumor foi confirmado como fator prognóstico independente (RASOTTO et al., 2017). De acordo com PENÃ et al., (1998) altos valores de índice de Ki67 foram positivamente correlacionados com metástase, morte por neoplasia, baixas taxas de sobrevida livre de doença e baixas taxas de sobrevivência.

De acordo com o Consenso Brasileiro de neoplasias mamárias em cães e gatos, o *cut-off* sugerido é $\geq 20\%$ (CASSALI et al., 2020) o que não corrobora aos nossos achados para carcinomas simples. Nossos resultados ampliam o conhecimento sobre os marcadores de prognóstico em tumores da glândula mamária em cães principalmente por individualizar os tipos histológicos, dessa

forma, trazendo resultados mais fidedignos em relação ao ponto de corte do Ki67. E sugerem que, além das variáveis clínico-patológicas já utilizadas atualmente, informações prognósticas adicionais podem ser obtidas por meio da análise da atividade proliferativa com o Ki67. Dessa forma, esse marcador pode ser incluído na avaliação de rotina dos tumores mamários para uma avaliação mais precisa sobre prognóstico levando em consideração esses resultados para carcinomas mamários simples.

6. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo indicaram que o índice de proliferação celular Ki67 nos pontos de corte 27% e 33% correlacionam significativamente com o menor tempo de sobrevida global de cadelas com carcinomas mamários simples dos histotipos papilares e tubulares, podendo ser usado como ferramenta para indicar o prognóstico e tomada de decisão terapêutica em cães com esses subtipos histológicos. Ademais, observou aumento do marcador na presença de fatores prognósticos desfavoráveis.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

ABUBAKAR, M., ORR, N., DALEY, F. *et al.* Prognostic value of automated Ki67 scoring in breast cancer: a centralised evaluation of 8088 patients from 10 study groups. **Breast Cancer Res** **18**, 104 (2016). <https://doi.org/10.1186/s13058-016-0765-6>

BEAUVAIS W, CARDWELL JM, BRODBELT DC. The effect of neutering on the risk of mammary tumours in dogs--a systematic review. **J Small Anim Pract.** 2012 Jun;53(6):314-22. doi: 10.1111/j.1748-5827.2011.01220.x. PMID: 22647210.

BRUNETTI, B. *et al.* p53, ER, and Ki67 expression in canine mammary carcinomas and correlation with pathological variables and prognosis. **Veterinary Pathology**, v. 58, n. 2, p. 325-331, 2021.

CARVALHO MI, PIRES I, PRADA J. Ki-67 and PCNA expression in canine mammary tumors and adjacent nonneoplastic mammary glands: prognostic impact by a multivariate survival analysis. **Vet Pathol.** 2016; 53:1138–46. 30.

CASSALI GD, BERTAGNOLLI AC, FERREIRA E, DAMASCENO KA, GAMBA CO, CAMPOS CB. Canine mammary mixed tumours: A review. **Veterinary Medicine International** 2012;2012:1–7.

CASSALI GD, LAVALLE GE, FERREIRA E, *et al.* Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors — 2013. **Braz J Vet Pathol** 2014;7:38–69.

CASSALI, *et al.* Consensus Regarding the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine and Feline Mammary Tumors. **Braz J Vet Pathol**, v.13, n. 3, p. 555 – 574, 2020.

CASSALI, *et al.*; Consensus Regarding the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors: Benign Mixed Tumors, Carcinomas in Mixed Tumors and Carcinosarcomas. **Braz J Vet Pathol**, v. 10, n. 3, p. 87 – 99, 2017.

CHEN RF, LI YY, LI LT, CHENG Q, JIANG G, ZHENG JN. Novel oncolytic adenovirus sensitizes renal cell carcinoma cells to radiotherapy via mitochondrial apoptotic cell death. **Mol Med Rep**. 2015;11(3):2141–6.

CHOI US, KIM DY. Immunocytochemical detection of Ki-67 in DifQuik-stained cytological smears of canine mammary gland tumours. **Cytopathology**. 2011;22:115–20.

CIRILLO JV. Tratamento quimioterápico das neoplasias mamárias em cadelas e gatas. **Rev Inst Ciênc Saúde**. 2008;26(3):325-7.

DAGLI ML, ZAIDAN. The search for suitable prognostic markers for canine mammary tumors: A promising outlook. **Veterinary Journal (London, England: 1997)**, v. 177, n. 1, p. 3-5, 2007.

DALECK, C. R., DE NARDI, A. B. 2016. **Oncologia em cães e gatos** 2. ed. Roca, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

DAVIDSON, A. P.; STABENFELDT, G. H. **A Glândula Mamária**. In: KLEIN, B.G. Tratado de Fisiologia Veterinária/ CUNNINGHAM. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. p. 439-448.

DE ARAÚJO, M. R. et al. Quantitation of the regional lymph node metastatic burden and prognosis in malignant mammary tumors of dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 5, p. 1360-1367, 2015.

DE MATOS, Augusto José Ferreira et al. MIB-1 labelling indices according to clinico-pathological variables in canine mammary tumours: a multivariate study. **Anticancer research**, v. 26, n. 3A, p. 1821-1826, 2006.

DE NARDI, A. B. et al. Neoplasias mamárias. **Oncologia em cães e gatos**, p. 371-383, 2009. EISENBERG ALA, KOIFMAN S. Breast cancer: Tumor markers. **Rev Bras Canc**, v. 47, p.377–388, 2001.

ELSTON CW, ELLIS IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology** 1991; 19:403-10

EMI TOKUDA MD, YOSHIYA HORIMOTO MD, ATSUSHI ARAKAWA MD, HIMURO T, SENUMA K, NAKAI K, et al. Differences in Ki67 expressions between preand post-neoadjuvant chemotherapy specimens might predict early recurrence of breast cancer. **Hum Pathol**. 2017;63:40–5. 24.

FITZGIBBONS PL, PAGE DL, WEAVER D, THOR AD, ALLRED DC, CLARK GM, RUBY SG, O'MALLEY F, SIMPSON JF, CONNOLLY JL, HAYES DF, EDGE SB, LICHTER A, SCHNITT SJ. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. **Arch Pathol Lab Med**. 2000 Jul;124(7):966-78. doi: 10.5858/2000-124-0966-PFIBC. PMID: 10888772.

FOSSUM, T. W. (2019). **Small animal surgery**. 5. Philadelphia, PA, Elsevier, Inc.

FOSTER, R. A. **Sistema Reprodutivo da Fêmea**. In: McGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. Bases da Patologia em Veterinária. 4ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p. 1263-1316.

FURIAN, M.; SANDEI, C.F.C.S.; ROCHA, E.J.N.; LOT, R.F.E. Retrospectivo dos tumores mamários em caninos e felinos atendidos no hospital veterinário da FAMED entre 2003 a 2007. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.4. 2007.

GIZINSKI S, BORYCZKO Z, KATKIEWICZ M. Ki-67 protein as a prognostic factor in mammary gland tumors in female dogs. **Med Weter**. 2003;59:888–91. 25.

GOLDSCHMIDT, M. et al. Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary pathology**, v. 48, n. 1, p. 117-131, 2011.

GUNDIM, L. F., DE ARAUJO, C. P., BLANCA, W. T., GUIMARÃES, E. C., & MEDEIROS, A. A. (2016). Clinical staging in bitches with mammary tumors: Influence of type and histological grade. **Canadian Journal of Veterinary Research**, 80(4), 318-322.

HATAKA, A. **Citologia aspirativa com agulha fina e histopatologia: valor e significado para diagnóstico e prognóstico do câncer de mama em cadelas**.

2004, 90f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista. Botucatu-SP. 2004.

HENDERSON, B.E. AND FEIGELSON, H.S. (2000) Hormonal Carcinogenesis. **Carcinogenesis**, 21, 427-433.

HENRY NL, HAYES DF. Cancer biomarkers. **Mol Oncol**. 2012 Apr;6(2):140-6. doi: 10.1016/j.molonc.2012.01.010. Epub 2012 Feb 6. PMID: 22356776; PMCID: PMC5528374.

HICKS, D. G., KULKARNI, S., & HAMMOND, E. H. (2008). The role of the indispensable surgical pathologist in treatment planning for breast cancer. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, 132(8), 1226-1227.

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

KADTHUR, J. C. et al. Prognostic value of Ki 67 proliferation antigen in canine malignant mammary gland tumours. **Braz J Vet Pathol**, v. 4, n. 1, p. 36-40, 2011.

KASZAK, L. et al. Current biomarkers of canine mammary tumors. **Acta veterinaria scandinavica**, v. 60, n. 1, p. 1-13, 2018.

KLOPFLEISCH, R.; GRUBER, A. D. Differential expression of cell cycle regulators p21, p27 and p53 in metastasizing canine mammary adenocarcinomas versus normal mammary glands. **Research in veterinary science**, v. 87, n. 1, p. 91-96, 2009.

KRISHNA, K. R., LATHA, M. J., LAKSHMAN, M., RANI, M. U., KUMAR, Y. R., & SWATHI, B. (2022). Expression pattern of PCNA and Ki-67 biomarkers in canine mammary tumours. **The Pharma Innovation Journal** 2022; SP-11(5): 233-237

LANA, SUSAN E.; RUTTEMAN, GERARD R.; WITHROW, STEPHEN J. Tumors of the mammary gland. In: **Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology**. WB Saunders, 2007. p. 619-636.

LASKIN JJ, NICHOLAS G, LEE C, GITLITZ B, VINCENT M, CORMIER Y, ET AL. PHASE I/II TRIAL OF CUSTIRSEn (OGX-011), an inhibitor of clusterin, in

combination with a gemcitabine and platinum regimen in patients with previously untreated advanced non-small cell lung cancer. **J Thorac Oncol**. 2012;7(3):579–86.

LAVALLE, G. E. et al. Canine malignant mammary gland neoplasms with advanced clinical staging treated with carboplatin and cyclooxygenase inhibitors. **in vivo**, v. 26, n. 3, p. 375-379, 2012.

LINDBLAD-TOH, K. et al. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. **Nature**, v. 438, n. 7069, p. 803-819, 2005.

MEDEIROS, Vítor Brasil. Câncer da mama na cadela. **Journal of Surgical and Clinical Research**, v. 8, n. 1, p. 118-129, 2017.

MENON SS, GURUVAYOORAPPAN C, SAKTHIVEL KM, RASMI RR. Ki-67 protein as a tumour proliferation marker. **Clin Chim Acta**. 2019 Apr;491:39-45. doi: 10.1016/j.cca.2019.01.011. Epub 2019 Jan 14. PMID: 30653951.

MORRIS, J.; DOBSON, J. GLÂNDULA MAMÁRIA. In. *Oncologia em Pequenos Animais*. São Paulo: Roca, 2007. p. 185-192.

MOULTON, J.E. (Ed.). **Tumors in domestic animals**, Berkeley, p.672. 1990.

NEUMANN S, SCHUETTLER J, FRENZ M. Investigation of serum Ki-67 as a biomarker in tumor-bearing dogs. **Res Vet Sci**. 2017;110:16–21.

NOWAK M, MADEJ JA, DZIEGIEL P. Expression of E-cadherin, β -catenin and Ki-67 antigen and their reciprocal relationships in mammary adenocarcinomas in bitches. **Folia Histochem Cytobiol**. 2007;45:233–8. 31.

NOWAK M, MADEJ JA, PULA B. Expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2), E-cadherin and Ki-67 in metastatic and non-metastatic canine mammary carcinomas. **Ir Vet J**. 2015;69:9. 26.

NUNES, F. C., CAMPOS, C. B., TEIXEIRA, S. V., BERTAGNOLLI, A. C., LAVALLE, G. E., & CASSALI, G. D. (2018). Epidemiological, clinical and

pathological evaluation of overall survival in canines with mammary neoplasms. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 70(6), 1714–1722.

OLIVEIRA FILHO JC, KOMMERS GD, MASUDA EK, et al. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. **Braz J Vet Res** 2010; 30:177–185.

PAYNE, S. J. L. et al. Predictive markers in breast cancer—the present. **Histopathology**, v. 52, n. 1, p. 82-90, 2008.

PEÑA, L. et al. Canine mammary tumors: a review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. **Veterinary pathology**, v. 51, n. 1, p. 127-145, 2014.

PENA, Laura L. et al. Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10, n. 3, p. 237-246, 1998.

QUEIROGA FL, RAPOSO T, CARVALHO MI. Canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: most recent findings. **Vivo**. 2011;25:455–66. 29.

RAKHA EA, ELLIS IO. Triple-negative/basal-like breast cancer: review. **Pathology**. 2009 Jan;41(1):40-7. doi: 10.1080/00313020802563510. PMID: 19089739.

RASOTTO R, BERLATO D, GOLDSCHMIDT MH, ZAPPULLI V. Prognostic Significance of Canine Mammary Tumor Histologic Subtypes: An Observational Cohort Study of 229 Cases. **Vet Pathol**. 2017 Jul;54(4):571-578. doi: 10.1177/0300985817698208. Epub 2017 Mar 29. PMID: 28355108.

RÊGO MAS, DOS SANTOS FL, RABELO SSA, DE ALMEIDA EL, DE LIMA ER, MENEZES MM. Master Thesis. Recife, Brazil: Universidade Federal Rural de Pernambuco; 2012. **Caracterização do perfil clínico, laboratorial, citológico e histopatológico em cadelas portadoras de tumor de mama submetidas à mastectomia**

RODRIGUES, H. et al. Clinicopathological significance of caspase-3 and ki-67 expression in canine mammary gland tumours. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 64, n. 1, p. 78-89, 2016.

SANTOS AA, LOPES CC, RIBEIRO JR, MARTINS LR, SANTOS JC, AMORIM IF, GÄRTNER F, MATOS AJ. Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. **BMC Vet Res**. 2013 Jan 4;9:1. doi: 10.1186/1746-6148-9-1. PMID: 23289974; PMCID: PMC3542312.

SENHORELLO, I. LS et al. Clinical value of carcinoembryonic antigen in mammary neoplasms of bitches. **Veterinary and comparative oncology**, v. 18, n. 3, p. 315-323, 2020.

SILVA, T. C. **Análise dos tipos histológicos do câncer de mama em cadelas e sua correlação com o perfil de expressão de proteínas associadas ao prognóstico**. Tese doutorado, USP, 2018

SORENMO, K. U.; DEANNA, R. W.; GOLDSMIDT, R. H. **Tumors of the mammary gland**. WITHROW SJ., VAIL DM. Withrow & MacEwens small animal clinical oncology. 2013.

STRATMANN N, FAILING K, RICHTER A, WEHREND A. Mammary tumor recurrence in bitches after regional mastectomy. **Vet Surg**. 2008 Jan;37(1):82-6. doi: 10.1111/j.1532-950X.2007.00351.x. PMID: 18199060.

TAVASOLY A, GOLSHAHI H, REZAIIE A, FARHADI M. Classification and grading of canine malignant mammary tumors. **Vet Res Forum** 2013;4:25–30.

THEJASWINI, K ASWANI KUMAR AND P ESWARA PRASAD. A study on Ki67 expression in canine mammary tumors. **The Pharma Innovation Journal**. 2022; 11(6S): 801-803.

TOKUDA, E. et al. Differences in Ki67 expressions between pre-and post-neoadjuvant chemotherapy specimens might predict early recurrence of breast cancer. **Human pathology**, v. 63, p. 40-45, 2017.

UXA, S., CASTILLO-BINDER, P., KOHLER, R. *et al.* Ki-67 gene expression. **Cell Death Differ** 28, 3357–3370 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41418-021-00823-x>

YANG, C., ZHANG, J., DING, M., XU, K., LI, L., MAO, L., & ZHENG, J. (2017). *Ki67 targeted strategies for cancer therapy*. **Clinical and Translational Oncology**, 20(5), 570–575. doi:10.1007/s12094-017-1774-3

YOSHIDA K, YOSHIDA S, CHOISUNIRACHON N, *et al.* The relationship between clinicopathological features and expression of epithelial and mesenchymal markers in spontaneous canine mammary gland tumors. **J Vet Med Sci** 2014;76:1321–1327.

ZUCCARI DA, SANTANA AE, CURY PM. Immunocytochemical study of Ki-67 as a prognostic marker in canine mammary neoplasia. **Vet Clin Pathol**. 2004;33:23–8. 28.

ANEXO