

Fatores prognósticos e preditivos nas neoplasias mamárias – importância dos marcadores imuno-histoquímicos nas espécies humana e canina – estudo comparativo

Prognostic and predictive factors in mammary neoplasias – immunohistochemical markers importance in human and canine species – comparative study

Debora A.P.C. Zuccari¹; Carla R. Berton²; Ana Carolina B. Terzian³; Camila M. Ruiz⁴

¹Centro Regional de Bioterismo*; ²Médica Veterinária - LABVET- Laboratório Veterinário - São José do Rio Preto, SP; ³Laboratório de Virologia*; ⁴Médica Veterinária - VETPAT - Laboratório de Patologia e Biologia Molecular Veterinária, Campinas, SP

* Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP - SP

Resumo O estudo dos tumores mamários em cadelas revela-se um excelente modelo para a investigação clínico-patológica, diagnóstica e prognóstica de neoplasias mamárias que acometem a espécie humana. Fatores relacionados com a incidência de tumores mamários estão sendo revistos. Assim buscou-se verificar o que há de consolidado em relação aos fatores prognósticos nas espécies humana e canina, e quais os marcadores que, embora ainda não sejam considerados como indispensáveis para a determinação do prognóstico da doença, oferecem informação útil na predição da resposta individual a um determinado tipo de tratamento. Esta revisão demonstra que a utilização de marcadores imuno-histoquímicos pode contribuir para um prognóstico tumoral mais criterioso, deixando-se de lado a classificação tumoral complexa e inconclusiva, como única resposta na busca de uma melhor e maior sobrevida ao paciente com câncer.

Palavras-chave Neoplasias Mamárias; Neoplasias Mamárias Animais; Marcadores Biológicos de Tumor; Imuno-histoquímica.

Abstract The investigation of the mammary tumors in female dogs has shown to be an excellent model for diagnostic, clinic-pathologic, and prognostic search for mammary neoplasias in human beings. Factors related with the mammary tumors incidence have been reviewed. Therefore, it has been surveyed what really exist about prognostic factors in human and canine species, and which markers that offer useful information about individual response to a particular treatment, although it does not have been considered indispensable for determination of disease prognosis. The use of those antibodies as a panel of markers may contribute for a more accurate tumoral prognosis, allowing us to go farther than the use of a non definitive and complex tumoral classification as the sole answer in the search of a better and longer life for the patient suffering mammary neoplasia.

Keywords Breast Neoplasms; Animal Mammary Neoplasms; Biological Markers Tumor; Immunohistochemistry.

Introdução

Tumores mamários em cães prestam-se como modelos apropriados, e válidos, ao estudo da biologia do câncer ¹, assim como para testes de agentes terapêuticos, já que animais de estimação têm tumores com apresentação histopatológica e comportamento biológico similares àqueles que acometem os seres humanos ². Além disso, os tumores de mama em cadelas constituem um desafio para clínicos e, principalmente, para patologistas, já que a nomenclatura e classificação desses tumores têm se revelado muito difíceis e controversas ³. Tumores mamários caninos e humanos compartilham importantes fatores epidemiológicos, clinicopatológicos e

bioquímicos ⁴. Sabe-se que em humanos um grande número de fatores é indicador do prognóstico do câncer de mama, incluindo tipo tumoral, tamanho e classificação, além de comprometimento ou não do tecido linfóide adjacente. Esses fatores podem ser utilizados sozinhos ou em combinação para o estabelecimento do prognóstico e evolução do caso ⁵. Consideram-se fatores prognósticos as características clínicas, patológicas e biológicas de pacientes com câncer e seus tumores, que prevêm o resultado clínico, isto é, a probabilidade da recidiva da doença ou sobrevivência do paciente, numa situação sem tratamento ⁶. Fatores relacionados com a incidência de tumores mamários estão ligados à idade avançada, cadelas não castradas ou

ovariectomizadas após os dois anos de idade e tratamentos anticoncepcionais aumentando o risco de desenvolvimento de tumores mamários em cadelas. Além disso, a obesidade na infância, dieta baseada em comida caseira estão relacionadas com maior ocorrência destes tumores em cadelas; a influência hormonal favorece o aparecimento de tumores mistos, considerados hormônio-dependentes. Ainda, outros aspectos estão sendo analisados como: idade avançada no momento do diagnóstico, crescimento invasivo, maior tamanho tumoral, ulceração da pele, envolvimento linfonodal axilar e/ou inguinal⁷.

Em cadelas, os maiores fatores preditivos para metástase, como comprometimento de linfonodo ou grau histológico do tumor, falharam em classificar os tumores mamários de acordo com seu comportamento clínico⁵. Dessa forma, embora se trate de um procedimento mais complexo, a avaliação da expressão de um ou mais imunomarcadores de prognóstico apresenta-se como uma ferramenta mais útil e conclusiva⁸.

Atualmente o estudo da expressão de marcadores prognósticos e preditivos do câncer de mama na mulher, através da metodologia de imuno-histoquímica, têm se revelado importante ferramenta de trabalho na rotina diagnóstica e de pesquisa⁹.

Ainda, 40 a 50% das mulheres com câncer de mama vão morrer em consequência da doença⁶. Para tentar melhorar tais previsões os oncologistas geralmente preconizam terapias adjuvantes após cirurgia inicial. Pesquisadores denominaram esse estudo de predição da resposta ao tratamento adjuvante de estudo de fatores preditivos⁶. Assim como em seres humanos, na veterinária o papel do patologista na avaliação dos tumores mamários transcende aquele de simplesmente caracterizar corretamente a histogênese das neoplasias. As informações como expressão de receptores hormonais ou mesmo características proliferativas do tumor são, sem dúvida, definitivas na escolha de um esquema terapêutico correto¹⁰.

Na medida em que avança a detecção mais precoce dos carcinomas mamários e melhoram os tratamentos para a doença, a busca por uma determinação acurada do prognóstico de cada paciente tem se tornado ainda mais importante. Trabalhos discutindo fatores prognósticos clássicos ou novos abundam na literatura, frequentemente com resultados conflitantes, deixando o cenário confuso para quem precisa tomar decisões diagnósticas e terapêuticas. Na ausência de conceitos universalmente aceitos sobre esta questão, eis que se torna necessário buscar outros fatores que possam predizer de forma mais acurada o prognóstico dos carcinomas da mama, e neste sentido têm sido empregados valorosos esforços.

Os (potenciais) fatores prognósticos para mulheres podem ser agrupados em 4 gerações. Na primeira geração, estariam os fatores clássicos, já conhecidos como o estágio (TNM), o subtipo histológico e a idade da paciente. A segunda geração inclui marcadores de reconhecida validade, como os receptores de estrogênio e progesterona, patologia quantitativa, também chamada de estereologia ou morfometria, que possibilita quantificar estruturas morfológicas além de marcadores de proliferação celular. Em relação à patologia quantitativa, a contagem de mitoses tem seu valor já bem definido, tanto que

faz parte da caracterização da diferenciação das lesões. A ploidia e a morfometria têm sido estudados, sem que se tenha definido, até agora, seu valor como fator independente de prognóstico. Na terceira geração estão os marcadores genéticos, como oncogenes (neu, myc, bcl2), genes mutados ou não expressos (p53, rb), proteases (catepsina D) entre outros. A quarta geração é constituída pelos chamados preditores de metástases órgão-específicas. Alguns estudos mostram que tumores que expressam o paratormônio ou possuem micrometástases na medula óssea, mais freqüentemente apresentam metástases ósseas¹¹.

Tendo como base as informações descritas tanto para mulheres como para cadelas este trabalho teve como objetivo verificar o que há de consolidado em relação aos fatores prognósticos e quais os imunomarcadores que oferecem informação útil no sentido não só prognóstico, como também na predição da resposta individual a um determinado tipo de tratamento.

Marcadores prognósticos e preditivos

Um marcador prognóstico pode ser definido como qualquer marcador capaz de, no momento do diagnóstico (ou cirurgia) da neoplasia, fornecer informações a respeito da sua evolução clínica. Para tal, este marcador deve estar relacionado a determinadas características biológicas envolvidas na transformação celular neoplásica, no crescimento tumoral ou no processo da cascata metastática. Este mesmo marcador poderá ser considerado como preditivo, quando fornecer informações úteis na seleção de pacientes susceptíveis à determinada terapêutica específica. O protótipo do marcador preditivo são os receptores hormonais que mediam a resposta à terapêutica hormonal adjuvante¹².

As características histopatológicas da lesão também revelam diferentes tipos de comportamento biológico. Assim, alguns dos tumores mamários de mulheres chamados “de tipo histológico especial”, como os carcinomas tubulares, por exemplo, tem um comportamento menos agressivo do que os carcinomas “de tipo histológico não especial”. Mesmo dentre as lesões de tipo histológico não especial, a diferenciação (formação de túbulos, grau nuclear e contagem de mitoses) permite classificá-las em lesões de alto grau, de grau intermediário e de baixo grau¹¹.

Este tipo de estratificação, no entanto, não é suficientemente específica. A variabilidade do comportamento biológico de lesões do mesmo tipo dentro do mesmo estágio é bem conhecida. Estudos importantes já mostravam que carcinomas do mesmo tipo e no mesmo estágio podem ter uma sobrevivência de alguns meses a algumas décadas. O Índice Prognóstico de Nottingham é um exemplo das tentativas de se predizer o comportamento da lesão. Tal índice é baseado no tamanho da lesão, no estágio axilar 1) todos os linfonodos livres; 2) metástase em até 3 linfonodos; 3) 4 ou mais linfonodos ou envolvimento de linfonodo apical e no grau histológico (de 1 a 3, baseado na formação de túbulos, aspecto nuclear e quantidade de mitoses). É calculado pela fórmula = tamanho da lesão em cm X 0,2 + estágio nodal + grau histológico. Alguns autores consideram este índice como a única ferramenta poderosa e independente

para prever prognóstico de carcinomas mamários¹¹. Os fatores prognósticos mais utilizados para o carcinoma mamário humano são principalmente os linfonodo-negativos, além do tamanho do tumor, o grau histológico, o estadiamento e o “status” hormonal. Dentre os marcadores biológicos, a expressão do p53 e c-erb-B2 está relacionada com tumores de alto risco, enquanto que a expressão de receptores hormonais está relacionada com tumores de baixo risco, baseados em parâmetros clínico-patológicos. Enquanto alguns trabalhos concluem que nenhum desses marcadores biológicos aparentemente tem um valor prognóstico independente¹³, outros demonstram que a positividade para receptores de estrogênio, junto com outros fatores clínicos como tamanho do tumor e “status” menopausal têm valor em mulheres¹⁴.

Poucos estudos têm medido a expressão dos marcadores biológicos no prognóstico dos tumores. Na medicina humana são considerados marcadores prognósticos para câncer de mama: receptores de estrogênio, receptores de progesterona, P53, Ki-67 e c-erb-B2. Esses marcadores são utilizados na rotina pós-cirúrgica como fatores preditivos e/ou prognósticos¹⁵. Entre outros marcadores biológicos em estudo como potenciais marcadores prognósticos estão o fator de proliferação celular PCNA⁶¹, marcadores de neoangiogênese¹¹, avaliação de apoptose tal como a caspase-3¹⁶ e outros como a catepsina D¹¹ e E-caderina¹⁷.

Em um trabalho realizado em 2000 em humanos foram avaliados os marcadores biológicos mais comumente utilizados na literatura, ou seja, P53, C-erb-B2, receptores de estrogênio e progesterona¹⁸. Este utiliza como parâmetros o tamanho do tumor, o estágio e o grau histológico. Quanto à conclusão do estudo obteve-se que, embora os marcadores biológicos tivessem tido correlação com os fatores clínico-patológicos como o grau histológico, eles não tiveram valor prognóstico independente em relação à sobrevivência das pacientes linfonodo-negativas¹⁸. Em cadelas, entretanto, chegou-se à conclusão que nem a presença de metástases linfonodais seria um fator prognóstico dos tumores de mama caninos¹⁹. Como já citado, poucos trabalhos encontrados na literatura avaliaram esses e outros marcadores em tumores caninos.

A diversidade dos resultados dos estudos em relação à validade do uso de marcadores biológicos é consequência de diversos fatores, desde dificuldades inerentes ao uso da imunohistoquímica até a variabilidade de anticorpos utilizados e as variações populacionais⁶.

A imunohistoquímica e seus marcadores

A técnica de imunohistoquímica foi iniciada com a marcação dos anticorpos com enzimas, que se mostraram instrumentos simples, versáteis e práticos para o diagnóstico histopatológico. Assim, a técnica de imunohistoquímica se baseia na capacidade que têm os anticorpos específicos de se ligarem a antígenos correspondentes. A reação de ligação não é visível a menos que o anticorpo esteja marcado com uma substância que absorva ou emita luz e que, assim, produza um contraste ou cor. O complexo enzima-anticorpo é capaz de se ligar ao antígeno específico no tecido e alterar a cor do cromogênio apropriado.

A peroxidase e a fosfatase alcalina são as enzimas mais usadas, sendo a peroxidase o marcador de preferência na maior parte das técnicas de diagnóstico imunohistoquímico²⁰. Segundo Gärtner (comunicação verbal) o método da imunohistoquímica tem revolucionado a classificação dos tumores de origem desconhecida, pois os anticorpos reconhecem antígenos que são expressos por células de histogênese específica.

Nas últimas décadas a imunohistoquímica tem revolucionado a prática da Anatomia Patológica. Além do inestimável auxílio ao diagnóstico de diferentes tipos de neoplasia, as técnicas imunohistoquímicas têm permitido a identificação de diferentes tipos de marcadores (enzimas, receptores, produtos de genes, etc.) que estão relacionados ao comportamento biológico das neoplasias tanto em mulheres como em cadelas^{12,21}. No campo da imunohistoquímica, a disponibilidade de anticorpos monoclonais que reagem com antígenos associados aos tumores de mama está se expandindo progressivamente e, dessa forma, vem permitindo que se conheça melhor a biologia da referida neoplasia, oferecendo, com isso, um prognóstico, um diagnóstico e um tratamento mais estruturado para o controle dessa classe tumoral. Neste contexto, o estudo das similaridades moleculares entre os tumores humanos e caninos pode ser de grande interesse, não somente do ponto de vista etiopatogenético, mas também por propiciar modelos animais adequados para o manejo clínico do câncer de mama^{1,21,22}.

Receptores hormonais

O estrogênio atravessa as membranas celular e nuclear por difusão passiva, sem a intervenção de canais ou proteínas transmembrana. Ao chegar ao núcleo, liga-se ao receptor de estrogênio, formando um complexo que ativa seqüências específicas de genes que, por sua vez, controlam o crescimento e a diferenciação celular. Desta forma, é responsável pela proliferação de células epiteliais durante o pico estrogênico do ciclo menstrual, e, indiretamente, pela sua posterior morte no final do ciclo. A relação do estrogênio com os carcinomas mamários não é uma novidade na literatura médica: Já em 1896, Beatson descreveu a regressão de metástases de carcinoma de mama em mulheres após ooforectomia, em paciente pré-menopausa. Seus achados, no entanto, foram ignorados até 1950, quando alguns estudos mostraram a regressão de tumores após adrenalectomia ou hipofisectomia, desta vez em mulheres menopausadas. Estes achados vieram ao encontro das descrições, em 1940, da influência de estrogênios sintéticos no crescimento de tumores mamários. Assim, temos, atualmente, três formas de tratamento hormonal para os carcinomas mamários: a) castração química por inibição da liberação de gonadotrofinas; b) inibidores da síntese de hormônios; c) antagonistas hormonais (Tamoxifen). Quando usada de forma aleatória, a terapêutica hormonal é eficaz em cerca de 30% dos casos. Por outro lado, cerca de 60% das pacientes com lesões positivas para receptores hormonais respondem a esta forma terapêutica, enquanto menos de 10% de pacientes com lesões negativas para receptores hormonais respondem ao tratamento¹¹.

Em relação ao receptor de progesterona em mulheres, cabe

mencionar que sua expressão é mediada pelo receptor de estrogênio, e sua positividade é considerada como um marcador de funcionamento dos receptores de estrogênio. Casos com receptor de estrogênio negativo e progesterona +, no entanto, insistem em aparecer tanto nas rotinas quanto na literatura. Embora seja um pouco variável, os relatos parecem indicar que entre cinco e 10% dos carcinomas mamários exibem este padrão. Tal perfil parece estar associado com raras respostas ao tratamento hormonal e com pior prognóstico¹¹.

Devemos lembrar que, tradicionalmente, os carcinomas mamários positivos para os receptores hormonais em mulheres eram considerados mais diferenciados e, por conseguinte, com melhor prognóstico. Estão sendo acumuladas evidências, no entanto, de que o risco dos tumores negativos comparado com os tumores positivos é pouco maior, e estatisticamente não significativo (odds ratio de 1,71, intervalo de confiança 95% de 0,87-3,33). Assim, a tendência atual é encarar o status dos receptores de estrogênio e progesterona mais como um marcador preditivo da resposta ao tratamento hormonal do que como marcador prognóstico propriamente dito. Em termos práticos, a marcação imuno-histoquímica dos receptores hormonais é especificamente nuclear, sendo os eventuais casos com padrão citoplasmático considerados negativos. Existem numerosos sistemas para expressar os resultados, mas o importante é que se relate a proporção de células neoplásicas positivas e a intensidade de coloração¹¹.

Em cadelas, a utilização de anticorpos contra os receptores hormonais não tem alcançado sucesso, pois não houve reação cruzada dos anticorpos utilizados da espécie humana para cadelas, inviabilizando seu estudo comparativo.

Oncogenes e genes supressores de tumor

As mutações dos oncogenes fazem com que as células passem a se dividir sem restrições, enquanto que as mutações dos genes supressores de tumor fazem com que haja a produção de proteínas defeituosas que não conseguem prevenir a replicação irregular das células, principalmente quando ocorre agressão ao DNA (radiação UV; Aflatoxina; Processos Oxidativos; etc.). Portanto, tanto os oncogenes, como os genes supressores de tumor, podem levar à formação de tumores malignos como resultado final de uma mutação, os oncogenes por serem ativados e os genes supressores de tumor por serem desativados

²³

Genes supressores de tumor

Os genes supressores de tumor, também chamados anti-oncogenes, são genes que estão envolvidos na regulação do crescimento celular, mas que podem se tornar causadores de cânceres quando danificados. Esses genes codificam a biossíntese de proteínas que estão envolvidas na inibição da proliferação celular e que são cruciais para o desenvolvimento e diferenciação celulares²⁴.

Gene p53

Inicialmente achava-se que o gene p53 codificava um antígeno tumoral endógeno e inclusive, acreditava-se ser um oncogene. Porém, sabe-se agora que o p53 é um gene supressor de tumor.

O gene p53 codifica uma fosfoproteína nuclear de 53kD com atividade supressora de tumor. O tipo selvagem da proteína P53, o qual é considerado um regulador de transcrição, está presente no núcleo das células de todos os mamíferos onde parece estar envolvido na regulação da proliferação celular e apoptose¹².

O gene p53, chamado de “guardião do genoma”, é um gene supressor de tumores, localizado no braço curto do cromossomo 17. Está mutado em cerca de 50% dos tumores humanos. Durante o ciclo celular, o p53 forma dímeros ao redor do DNA, interrompendo o ciclo celular, de maneira a permitir o reparo do DNA. Se tal reparo não funciona, o p53 induz a apoptose. Uma mutação do gene p53 causa a perda dessa proteção celular, desestabiliza o genoma e permite a produção de uma proteína P53 defeituosa, não funcionando, que se acumula na célula e é eliminada mais vagarosamente, o que permite a sua detecção pela técnica da imuno-histoquímica⁽²³⁾. Em condições normais possui uma vida muito curta, 15 a 45 minutos em células de ratos; 2 horas em melanócitos humanos e 4 a 5 horas em queratinócitos humanos, sendo degradada imediatamente após ter cumprido a sua função. Já em células normais a concentração da proteína está abaixo do limiar de detecção por métodos de imuno-histoquímica. Na célula normal o gene p53 controla sua regulação através da ativação do gene mdm-2 que codifica a proteína MDM-2. A MDM 2 se liga ao domínio de ativação inibindo a habilidade do p53 de estimular a transcrição. Isso demonstra mais uma vez porque na célula normal o p53 dura apenas alguns minutos, o que não acontece com o gene p53 mutante que não mais vai ativar o mdm-2, promovendo o seu próprio acúmulo na célula alterada²⁵.

A expressão exacerbada desta proteína tem sido observada em grande número de tumores, incluindo carcinomas mamários e está associada com a agressividade tumoral em humanos¹¹.

Em estudo recente, a expressão da P53 demonstrou ser maior nos carcinomas, considerados mais malignos que os tumores mistos em cadelas. A avaliação estatística não confirmou esta tendência demonstrando que não houve correlação significativa de sua expressão com metástase, sobrevida ou tempo livre da doença nem com o diagnóstico tumoral. Entretanto, pelo Teste de Fisher foi observada uma associação da expressão de P53 com a idade das cadelas com neoplasia mamária. A expressão intensa estava presente em cadelas jovens (Figura A)²⁶.

Considera-se que o gene p53 é a chave reguladora de grande parte dos processos celulares inclusive do ciclo celular, reparo do DNA, estabilização do genoma, morte celular programada, diferenciação, senescência e angiogênese. Além disso, o p53 é o maior componente da resposta celular ao dano do DNA nas células dos mamíferos²⁵.

O padrão de marcação imuno-histoquímica do p53 é nuclear e, em geral, sua expressão é avaliada em relação à intensidade da coloração e à proporção de células coradas, de forma parecida com os receptores hormonais. Nos carcinomas mamários de mulheres, a expressão do p53 está associada a fenótipos mais agressivos e pior prognóstico, especialmente em pacientes sem metástases em linfonodos. O quadro parece ser ainda pior quando a mesma lesão co-expressa c-erb-B2 e p53. Postula-se

que pacientes que exibem alterações em ambos os genes (localizados no cromossomo 17) perderam um mecanismo chave de controle da proliferação celular, ganhando um ativador de potencial maligno, o que resulta neste fenótipo agressivo¹¹. Em relação aos carcinomas ductais “in situ”, alguns comentários merecem ser feitos. A mutação do p53 parece ser um evento que antecede a invasão nos carcinomas ductais de mama, de maneira similar a outros tumores sólidos¹¹. Outro estudo mostrou uma boa correlação entre o grau na classificação de Van Nuys e a expressão de p53 e c-erbB-2. Em seus achados, a expressão imuno-histoquímica do p53 foi observada unicamente em lesões grau 3, e a do c-erbB-2 foi encontrada em lesões de graus 2 e 3, demonstrando que suas expressões estão associadas a lesões de alto grau.

A ocorrência de mutações específicas no gene p53 estão associadas com resistência primária à quimioterapia e recidiva precoce em pacientes com câncer de mama. Essas observações confirmam aquelas segundo as quais as mutações no p53 estão associadas à baixa sobrevivência de pacientes portadores de câncer e o seu estudo, como marcador prognóstico, pode prever o comportamento clínico e a resposta à terapia no câncer de mama de mulheres¹². Considera-se que a expressão do mutante da proteína P53 está associada com taxa de proliferação tumoral alta, recorrência precoce da doença e menor sobrevida nas neoplasias mamárias linfonodo-negativas²⁷.

Quando é procedida a análise da imuno-expressão da P53, tal análise reveste-se de importância na avaliação da porcentagem de células marcadas, assim como da intensidade da marcação¹². Ainda que estudos in vitro, sugeriram que o p53 mutante pode estar associado com a resistência à quimioterapia e à radiação, em certos tipos de linhagens celulares, os resultados são ambíguos na prática clínica do câncer de mama⁶.

Assim, para uma correta avaliação da eficiência da P53 como um marcador prognóstico de neoplasias mamárias em mulheres, devemos levar em consideração as muitas questões de ordem técnica relacionadas com os diferentes reagentes, a preparação do material citoquímico e/ou histoquímico e com a interpretação dos resultados da imuno-marcação⁶.

ONCOGENE - C-erb-B-2 (The human epidermal growth factor receptor-2)

O proto-oncogene C-erb-B-2 ou oncogene HER-2/neu como vem sendo chamado na literatura, tem sido mundialmente estudado dentro do contexto das neoplasias mamárias, já que a sua amplificação ocorre principalmente nessa classe tumoral²⁸. Trata-se de gene localizado no cromossomo 17 que codifica uma proteína receptora transmembranar de 185 Kda semelhante ao receptor do fator de crescimento epidérmico. Sua expressão, desta maneira, reflete um aumento da atividade proliferativa da lesão.

Expresso em cerca de 10 a 20% dos casos de carcinomas de mama, o c-erbB-2 tem correlação com a sobrevida, especialmente em pacientes com metástases axilares⁹. Observou-se a expressão de C-erb-B-2 em carcinomas intraductais e carcinomas invasivos²⁹. A amplificação deste gene em mulheres está associada à ocorrência de carcinomas ductais pouco

diferenciados e a um prognóstico ruim³⁰. O termo amplificação se refere ao seletivo aumento do número de cópias do gene e é melhor designado amplificação do DNA.

Considera-se, também, que a sua amplificação possa alterar a quimiossensibilidade do tumor à quimioterapia citotóxica, particularmente às antraciclina. Além da sua utilização diagnóstica e prognóstica, estão sendo estudadas também a utilização do tratamento utilizando um anticorpo contra a proteína codificada pelo gene, pois como ela induz o tumor ao crescimento, o seu controle pode significar uma potencial modalidade de terapia contra o câncer de mama³⁰.

Estudos indicam que o gene está superexpresso/amplificado em 15 a 30% dos carcinomas ductais infiltrantes da mama, 50% dos carcinomas ductais “in situ” e em 90% dos casos de Paget do mamilo³¹. De um modo geral, assume-se que pacientes com expressão de c-erbB-2, especialmente no grupo com metástases em linfonodos, têm um prognóstico pior¹¹. Além disso, observa-se que tais lesões têm maior resistência ao tratamento hormonal¹¹, e podem ser beneficiadas pela utilização de quimioterapia adjuvante de altas doses, com a utilização de doxorubicina³¹. Por outro lado, já em 1989, foi descrito que anticorpos contra c-erbB-2 podem inibir o crescimento de linhagem de carcinoma mamário “in vitro”. Tal fato suscitou ampla pesquisa, levando ao desenvolvimento de uma droga chamada Trastuzumab (Herceptin), que pode ser oferecida como alternativa terapêutica às pacientes com amplificação/superexpressão de c-erbB-2³². O resultado da imuno-histoquímica costuma ser expresso em um sistema de 4 classes (0 para negativo, 1+, 2+ e 3+). A concordância entre os resultados da detecção imuno-histoquímica do c-erbB-2 e da amplificação gênica detectada pelo FISH não é absoluta, mas se a imuno-histoquímica for positiva 3+, a concordância é de 95,9%, caindo para 85,9% quando se incluem os casos positivos 2+¹¹.

Considera-se a positividade imuno-histoquímica a esse marcador um fator prognóstico desfavorável com diminuição do tempo de remissão da doença e diminuição da sobrevida³³. Trabalhos demonstram que a sobrevida média é reduzida em 50% em pacientes que expressam o anticorpo c-erbB-2, aqui chamado HER-2/neu, comparados aos HER-2 negativos⁸. A positividade para o esse anticorpo pode inclusive prever o resultado da terapia, demonstrando uma resistência ao tamoxifen e outras terapias hormonais. Os pacientes positivos para o HER-2 podem responder melhor a dosagens maiores de antraciclina, e pior à ciclofosfamida, metotrexate e 5-fluorouracil, do que pacientes negativos⁸.

Na espécie canina é descrita uma super-expressão do c-erbB-2 correlacionada com o diagnóstico histopatológico de malignidade mas não com a presença de invasão local ou doença metastática regional⁽³⁴⁾.

Marcadores de proliferação celular

A proliferação de células tumorais está relacionada com o prognóstico em muitos tumores. Considera que a proliferação tumoral é inversamente proporcional à sobrevida de pacientes com carcinoma mamário³⁵.

Contudo, segundo Brown e Gatter (1990) a contagem do número

de mitoses presentes nas preparações histopatológicas pode ser trabalhosa, difícil e diferir entre patologistas. Além disso, alguns pesquisadores consideram a contagem de figuras de mitose um indicador prognóstico não seguro, uma vez que apenas reflete uma fase do ciclo celular (a fase mitótica ou fase M)³⁶.

O método que vem sendo mais utilizado recentemente é a avaliação imuno-histoquímica do potencial proliferativo por detecção de proteínas nucleares relacionadas com a replicação do DNA. Os dois marcadores mais estudados na veterinária são o Ki-67 e o PCNA³⁹.

Ki-67

O Ki-67 é um antígeno nuclear que está presente nas fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e M), mas está ausente na fase G0 (repouso) das células. Entretanto, informações sobre sua localização intranuclear são confusas e controversas. Estudou-se sua localização nuclear e concluíram que o Ki-67 é uma proteína associada à cromatina e topograficamente situada em regiões densas, provavelmente permeando a heterocromatina³⁷. Considera-se que valores aumentados de Ki-67 têm correlação positiva com metástase, morte por neoplasia e baixa taxa de sobrevivência sem doença⁷. Considera-se que não é possível a utilização de anticorpos anti-Ki-67 para discriminar entre processos benignos e malignos, em casos individuais³⁶.

Em um estudo desenvolvido com a utilização dos marcadores Ki-67, C-erb-B2 e P53 observou-se, que em tumores mistos de cadelas a marcação com Ki-67 é principalmente observada em células epiteliais se comparadas às áreas proliferativas de células fusiformes (Figura B). Em tumores malignos a maioria das células positivas estava presente na periferia dos tumores. A expressão da P53 foi vista em tumores malignos pouco diferenciados enquanto que a expressão do C-erb-B2 foi positiva em quase todos os tumores³⁸.

Assim, anticorpos específicos para a proteína Ki-67 abrem caminho para o acesso imuno-histoquímico à proliferação celular, particularmente útil em numerosos estudos de valor prognóstico do crescimento celular em neoplasias humanas³⁹. O descobrimento de equivalentes do Ki-67 em outras espécies é muito vantajoso para uma investigação precisa dos requerimentos estruturais de uma função ainda desconhecida³⁹.

PCNA

O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é uma proteína nuclear ácida de 36 kDa que funciona como co-fator da DNA-polimerase delta⁴⁰. Foi originalmente detectado durante experimentos com soro de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, em virtude de sua reação positiva com núcleos de células em proliferação e negativa com células em repouso de tecido normal humano⁴¹. Ele está presente em todas as fases do ciclo celular, mas sua síntese é maior na fase S, além de também estar associada tanto na replicação como no reparo do DNA⁴². Há trabalhos procurando relacionar a imuno-expressão do PCNA com o grau, bem como com o comportamento biológico de diversos tumores inclusive no câncer de mama⁴³. Sua

distribuição no ciclo celular aumenta a partir da fase G1, atingindo o pico máximo em S, diminuindo a partir da fase G2, e passando a exibir níveis tão baixos na fase M e em células quiescentes, que não é identificado por métodos imuno-histoquímicos⁴⁴. A ausência de PCNA nas reações de duplicação de DNA resulta no acúmulo de fitas sequenciais nascentes e até mesmo na quiescência das células. O gene que codifica o PCNA tem sido clonado em diversas espécies e, embora ocorram pequenas diferenças ao nível de DNA, existe considerável semelhança entre o PCNA humano e de outras espécies⁴².

Porém o PCNA não pode ser considerado um bom marcador de proliferação celular, visto que os níveis de PCNA podem manter-se elevados quando induzidos por fatores de crescimento, como resultado de danos ao DNA⁴⁵. Além deste, outros fatores podem influenciar como o tipo de fixador, tempo de fixação, estado do espécime, e o inconveniente de o PCNA ter uma meia vida bastante longa, indicando que o núcleo celular pode permanecer PCNA positivo mesmo após o estímulo. A marcação do PCNA pode ser observada na Figura C.

Outros marcadores

E-CADERINA

A E-caderina é uma proteína que confere aderência às células e é de grande importância na diferenciação epitelial. Dados sugerem que a E-caderina é um potente supressor de invasão nos tumores mamários e a perda da sua expressão tem relação com um prognóstico ruim¹⁷. A perda ou diminuição da expressão da E-caderina tem sido associada a pior diferenciação de vários tumores, nomeadamente cólon, pâncreas bexiga e mama⁴⁶. Segundo um estudo a perda da expressão da E-caderina, associada com alterações na adesão entre as células, tem associação significativamente alta com a sobrevivência do paciente (P=0,020) e o período livre de metástases (P=0,0052), sendo assim, a E-caderina tem alta significância como fator prognóstico⁴⁷. O gene E-caderina está localizado no cromossomo humano na região 16q22.1, região frequentemente afetada por baixa heterozigose em neoplasias mamárias esporádicas¹⁷. A alta expressão da E-caderina nos indica que a adesão entre as células está preservada e, deste modo, o risco de metástases à distância é consideravelmente baixo já que a possibilidade de células neoplásicas atingirem a corrente circulatória é quase que nula (Figura D).

CATEPSINA D

É uma proteinase ácida lisossomal. Em radioimunoensaio, mostrou associação com agressividade (tumores grandes, grau histológico alto, metástases em linfonodos). Quando se passou a utilizar a imuno-histoquímica, alguns estudos mostraram esta associação apenas se os macrófagos estromais eram positivos. Desta forma, sua relação com a agressividade do tumor passou a ser encarada como um epifenômeno, relacionado à inflamação e a macrófagos estromais. Há estudos, no entanto, que afirmam que pacientes com expressão elevada de catepsina D apresentam menor tempo de sobrevida livre de doença a curto prazo (até 3 anos)¹¹.

MARCADORES DE NEO-ANGIOGÊNESE

Definida como a geração de novos vasos a partir do leito vascular pré-existente, a neo-angiogênese tem sido uma fonte inesgotável de publicações, liderada pelo grupo de Judah Folkman¹¹. Para a grande maioria dos tumores, que cresce por destruição do tecido adjacente, parece ser verdade que a lesão pode crescer independente de neovascularização até um tamanho não superior a 2-3 milímetros. Até este tamanho, os nutrientes podem chegar às células por difusão. Depois disso, seu crescimento exigirá a presença de vasos. Dois tipos de exceção parecem existir. No primeiro tipo, no qual se destacam alguns tumores pulmonares, a lesão cresce não destruindo o tecido, mas substituindo-o, utilizando-se, desta forma, da rede vascular pré-existente. No outro tipo, como em alguns melanomas de retina, a lesão forma canalículos (positivos ao PAS) desprovidos de endotélio, que exercem a função de mimetizá-los (vasculogenic mimicry)¹¹. De importância biológica indiscutível, já que drogas anti-angiogênicas oferecem uma nova possibilidade terapêutica podendo, portanto, ser validado como valor preditivo de resposta a este tratamento, a importância da angiogênese como fator isolado de prognóstico no carcinoma mamário ainda é fonte de discussão. Noel Weidner, um dos pesquisadores que mais publica nesta área, defende que, se forem utilizados os pontos em que os vasos estão mais proliferados (“hot spots”), e todos os vasos e/ou células individuais marcadas pelo CD31 forem contados em um médio aumento (200 vezes), a contagem de vasos teria valor prognóstico. Outros estudos, no entanto, não conseguiram mostrar tal relação⁴⁹.

CASPASE-3

As alterações moleculares que são observadas nas células do paciente com câncer, começam a ser compreendidas e estão relacionadas com os mecanismos que regulam a divisão celular normal, a sobrevivência e a morte celular. A morte celular programada, chamada de apoptose, tem um papel importante na determinação do crescimento tumoral e sua agressividade¹⁷. O início do processo apoptótico é rigidamente controlado por determinadas proteases, chamadas de caspases, que são ativadas pela clivagem proteolítica em resposta a sinais que induzem à morte celular programada¹⁷. A utilização dos marcadores de apoptose é considerada muito importante para caracterizar biologicamente o tumor, pois este fenômeno possui um papel fundamental na tumorigênese⁴⁹.

A caspase-3 vem sendo foco de estudos relacionados ao mecanismo da apoptose, tornando-se peça-chave no entendimento dos mecanismos de morte celular, uma vez que é ativada em resposta a vários estímulos, como as drogas quimioterápicas, podendo sugerir que a marcação da caspase-3 possa ser usada no controle da resposta aos tratamentos quimioterápicos quanto a possível resistência da droga⁴⁹, e a diminuição da expressão possa indicar um mecanismo importante de sobrevivência celular em pacientes com câncer de mama⁵⁰. A apoptose pode ser detectada pela microscopia, na histopatologia convencional, ou então, evidenciada por técnicas especiais, com a técnica de imuno-histoquímica⁵¹.

Considerações finais

Embora ainda não se tenha unanimidade sobre a validade individual dos marcadores imuno-histoquímicos mais comumente utilizados nos painéis de mama na mulher, parece haver um consenso sobre os alguns pontos. É importante verificar o status hormonal, para que se possa saber com certo grau de certeza, as chances de uma determinada lesão responder à terapêutica hormonal. Como não houve expressão destes marcadores na espécie canina, podemos utilizar a história clínica do paciente para realizar a OH (ovariohisterectomia) no momento da exérese tumoral com o intuito de que este animal não mais receba estímulo hormonal e com isso haja recidiva. Como marcador de bom prognóstico na espécie podemos utilizar a e-caderina, cuja expressão demonstrou ser estatisticamente significativa para prever a possibilidade de metastização do processo⁴⁷. Da mesma forma, os marcadores de proliferação celular mostram ser importantes para prever o prognóstico da lesão e já foram testados. Assim, avaliar a proliferação celular através do Ki-67 parece ser útil na medida em que tumores com maior índice de proliferação são mais agressivos. Além disso, este índice pode ser uma informação preditiva importante na utilização de quimioterapia adjuvante. Apesar de ainda não haver consenso em relação à sua validade como fator prognóstico isolado, considerando a utilidade do c-erbB-2 em prever a resposta ao tratamento com o Herceptin³⁰, é interessante que se teste este marcador; o resultado, expresso em cruzes de 0 a 3, é considerado positivo nos casos de 2+ e 3+. A importância de se avaliar a expressão do p53 ainda não está definida, mas os dados parecem cada vez mais indicar que pacientes com essa mutação de fato exibem pior prognóstico²⁶. Sorenmo (2003) propõe um tratamento direcionado aos fatores prognósticos estabelecidos relacionando estudos em cadelas com o tratamento recomendado para o câncer mamário em mulheres⁵². Esta revisão demonstra ainda que com a utilização desses anticorpos, juntamente com outros que podem formar um painel de marcadores, pode contribuir para um prognóstico tumoral mais criterioso, deixando-se de lado a classificação tumoral complexa e inconclusiva, como única resposta na busca de uma melhor e maior sobrevida ao paciente com câncer. Na Medicina Veterinária em especial, o pequeno número de pesquisas, buscando novos marcadores prognósticos e preditivos para a neoplasia mamária mostra um imenso campo de pesquisa a ser desenvolvido.

Referências bibliográficas

1. Mottolose M, Morelli L, Agrimi U, Benevolo M, Sciarretta F, Antonucci G et al. Spontaneous canine mammary tumors. A model for monoclonal antibody diagnosis and treatment of human breast cancer. *Lab Invest* 1994 Aug;71(2):182-7.
2. Peleteiro MC. Tumores mamários na cadela e na gata. *Rev Port Ciênc Vet* 1994;89(509):10-29.
3. Brodey RS, Goldschmidt MH, Roszel JR. Canine mammary gland neoplasms. *J Am Anim Hosp Assoc* 1983;19:61-90.
4. Kumaraguruparan R, Prathiba D, Nagini S. Of humans and canines: immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours. *Res Vet Sci* 2006;

81(2):218-24.

5. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002;415(6871):530-6.
6. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 1998;11(2):155-68.
7. Peña LL, Nieto AI, Pérez-Alenza D, Cuesta P, Castaño M. Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. *J Vet Diagn Invest* 1998;10(3):237-46.
8. Thomas E, Berner G. Prognostic and predictive implications of HER2 status for breast cancer patients. *Eur J Oncol Nurs* 2000;4(Sa):10-7.
9. Kandioler-Eckersberger D, Ludwig C, Rudas M, Kappel S, Janschek E, Wenzel C et al. TP53 mutation and p53 overexpression for prediction of response to neoadjuvant treatment in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2000;6(1):50-6.
10. Cassali GD. Estudo morfológico, imuno-histoquímico e citométrico de tumores mamários da cadela: aspectos comparativos com neoplasias da mama humana [tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2000.
11. Eisenberg ALA, Koifman S. Câncer de mama: marcadores tumorais (revisão de literatura). *Rev Bras Cancerol* 2001;47(4):377-88.
12. Schmitt FC, Soares R, Cirnes L, Seruca R. P53 in breast carcinomas: association between presence of mutation and immunohistochemical expression using a semiquantitative approach. *Pathol Res Pract* 1998;194(12):815-9.
13. Kato T, Kimura T, Takami N, Miyakawa R, Tanaka S, Muraki H et al. New prognostic factors associated with long-term survival in node-negative breast cancer patients. *Breast Cancer* 1999;6(4):370-7.
14. Volpi A, De Paola F, Nanni O, Granato AM, Bajorko P, Becciolini A et al. Prognostic significance of biologic markers in node-negative breast cancer patients: a prospective study. *Breast Cancer Res Treat* 2000;63(3):181-92.
15. Crosier M, Scott D, Wilson RG, Griffiths CD, May FE, Westley BR. Differences in Ki67 and c-erbB2 expression between screen-detected and true interval breast cancers. *Clin Cancer Res* 1999;5(10):2682-8.
16. Alberts BB, Lewis JD, Raff M, Roberts K, Watson JD. Tecidos. In: Alberts BB, Lewis JD, Raff M, Roberts K, Watson JD. Fundamentos da biologia celular: uma introdução à biologia molecular da célula. Porto Alegre: Artmed; 1999. p. 609-47.
17. Oesterreich S, Deng W, Jiang S, Cui X, Ivanova M, Schiff R et al. Estrogen-mediated down-regulation of E-cadherin in breast cancer cells. *Cancer Res* 2003;63(17):5203-8.
18. Reed W, Hannisdal E, Boehler PJ, Gundersen S, Host H, Marthin J. The prognostic value of p53 and C-erb B-2 immunostaining is overrated for patients with lymph node negative breast carcinoma: a multivariate analysis of prognostic factors in 613 patients with a follow-up of 14-30 years. *Cancer* 2000;88(4):804-13.
19. Sartin EA, Barnes S, Kwapien RP, Wolfe LG. Estrogen and progesterone receptor status of mammary carcinomas and correlation with clinical outcome in dogs. *Am J Vet Res* 1992;53(11):2196-200.
20. Boenish T. Immunochemical staining methods. Denmark: DakoCytomation; 1989.
21. Zuccari DAPC. Estudo imunocitoquímico de marcadores diagnósticos e prognósticos em neoplasias mamárias caninas [tese]. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista; 2001.
22. Zuccari DAPC. Contribuição ao estudo imunoistoquímico dos tumores mamários em cadelas [dissertação]. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista; 1999.
23. Souza DMB. Caracterização patológica e gênica (gene p53) dos tumores mamários em cadelas [tese]. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco; 2006.
24. Lewin B. Oncogenes e Cancer. In: _____. Genes. 6th ed. New York: Oxford Press; 1997. cap. 37, p. 1134-5.
25. May P, May E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* 1999;18(53):7621-36.
26. Zuccari DAPC, Terzian ACB, Pereira RS, Pavam MV, Ruiz CM, Sueiro FAR et al. Avaliação imuno-histoquímica da gene P53 nas neoplasias mamárias em cadelas. *ARS Vet* 2005;21:55-90.
27. Allred DC, Clark GM, Elledge R, Fuqua SA, Brown RW, Chamness GC et al. Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993 Feb 3;85(3):200-6.
28. van De Vijver MJ. Genetic alterations in breast cancer. *Curr Diagn Pathol* 2000;6(4):271-81. [cited 2007 June 8]. Available from: <http://www.idealibrary.com.br>
29. Schmitt FC, Figueiredo P, Lacerda M. Expression of c-erb B-2 protein and DNA ploidy in breast carcinogenesis. *Arch Pathol Lab Med* 1995;119(9):815-20.
30. Järvinen TA, Liu ET. Effects of HER-2/neu on chemosensitivity of tumor cells. *Drug Resist Updat* 2000;3(6):319-24.
31. Muss HB, Thor AD, Berry DA, Kute T, Liu ET, Koerner F et al. c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *New Engl J Med* 1994;330(18):1260-6.
32. Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Oncologist* 1998;3(4):237-52.
33. Climent MA, Seguí MA, Peiró G, Molina R, Lerma E, Ojeda B et al. Prognostic value of HER-2/neu and p53 expression in node-positive breast cancer. HER-2/neu effect on adjuvant tamoxifen treatment. *Breast* 2001;10(1):67-77.
34. Ahern TE, Bird RC, Bird AE, Wolfe LG. Expression of the oncogene c-erbB-2 in canine mammary cancers and tumor-derived cell lines. *Am J Vet Res* 1996;57(5):693-6.
35. Weidner N, Moore II DH, Vartanian R. Correlation of Ki-67 antigen expression with mitotic figure index and tumor grade in breast carcinomas using the novel "paraffin" – reactive mib1 antibody. *Hum Pathol* 1994;25(4):337-42.
36. Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology* 1990;17(6):489-503.

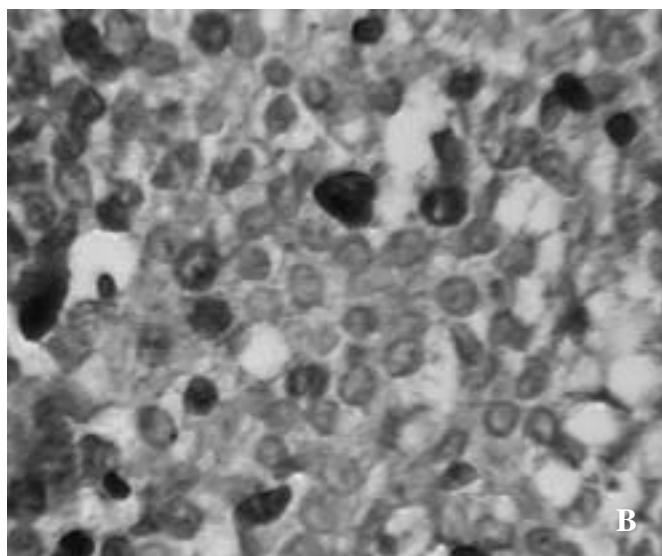
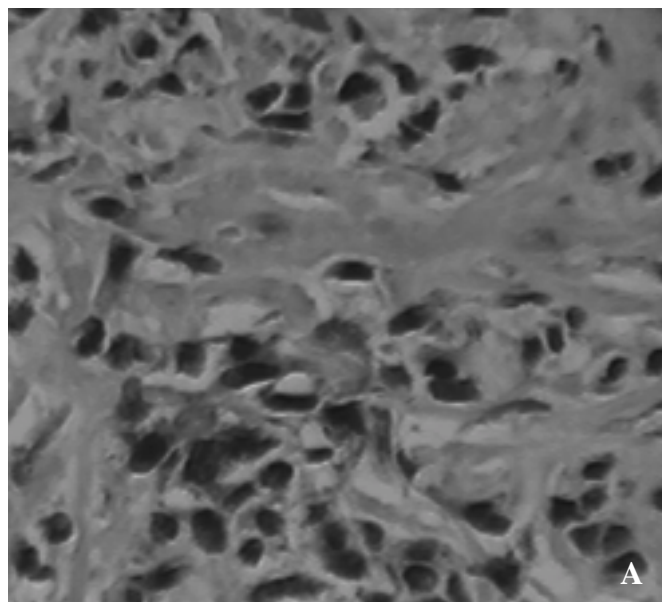
37. Kreitz S, Fackelmayer FO, Gerdes J, Knippers R. The proliferation-specific human Ki-67 protein is a constituent of compact chromatin. *Exp Cell Res* 2000;261(1):284-92.
38. Cassali G, Gartner F, Tafuri WL, Schmitt FC. Canine mammary tumours: a morphological and immunohistochemical study: comparative aspects with human breast tumours. In: 17th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology; 1999; Nantes. Proceedings. Nantes: Veterinary School of Nantes; 1999. p. 267.
39. Zuccari DAPC, Santana AE, Cury PM, Cordeiro JA. Immunocytochemical study of Ki-67 as a prognostic marker in canine mammary neoplasia. *Vet Clin Pathol* 2004;33(1):23-8.
40. Oyama T, Mitsudomi T, Mizone T, Ohgami T, Nakanishi R, Yasumoto K. Proliferating cell nuclear antigen may be superior to argyrophilic nucleolar organizer regions in predicting shortened survival of patients with non-small cell lung cancer. *Surg Oncol* 1995;4(2):83-9.
41. Miyachi K, Fritzier MJ, Tan EM. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 1978;121(6):2228-34.
42. McCormick D, Hall PA. The complexities of proliferating cell nuclear antigen. *Histopathology* 1992;21(6):591-4
43. Niezabitowski A, Rys J, Lackowska B, Dyba T, Stelmach A, Gruchala A et al. Relationship of histology, DNA-values and proliferative activity in unselected breast cancer patients (a preliminary study). *Pol J Pathol* 1995;46(1):23-8.
44. Martinez-Lara I, González-Moles MA, Ruiz-Avila I, Bravo M, Ramos MC, Fernández-Martínez JA. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as a marker of dysplasia in oral mucosa. *Acta Stomatol Belg* 1996;93(1):29-32.
45. Mighell A. PCNA and p53. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1995;31B(6):403-4.
46. Glukhova M, Koteliansky V, Sastre X, Thiery JP. Adhesion systems in normal breast and in invasive breast carcinoma. *Am J Pathol* 1995;146(3):706-16.
47. Pedersen KB, Nesland JM, Fodstad Ø, Maelandsmo GM. Expression of S100A4, E-cadherin, alpha- and beta-catenin in breast cancer biopsies. *Br J Cancer* 2002;87(11):1281-6.
48. Ahlgren J, Risberg B, Villman K, Bergh J. Angiogenesis in invasive breast carcinoma—a prospective study of tumour heterogeneity. *Eur J Cancer* 2002;38(1):64-9.
49. de Jong JS, van Diest PJ, Baak JP. Number of apoptotic cells as a prognostic marker in invasive breast cancer. *Br J Cancer* 2000;82(2):368-73.
50. O'Donovan N, Crown J, Stunell H, Hill AD, McDermott E, O'Higgins N et al. Caspase 3 in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9(2):738-42.
51. Lipponen P. Apoptosis in breast cancer: relationship with other pathological parameters. *Endocr Relat Cancer* 1999;6(1):13-6
52. Sorenmo K. Canine mammary gland tumors. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2003;33(3):573-96.

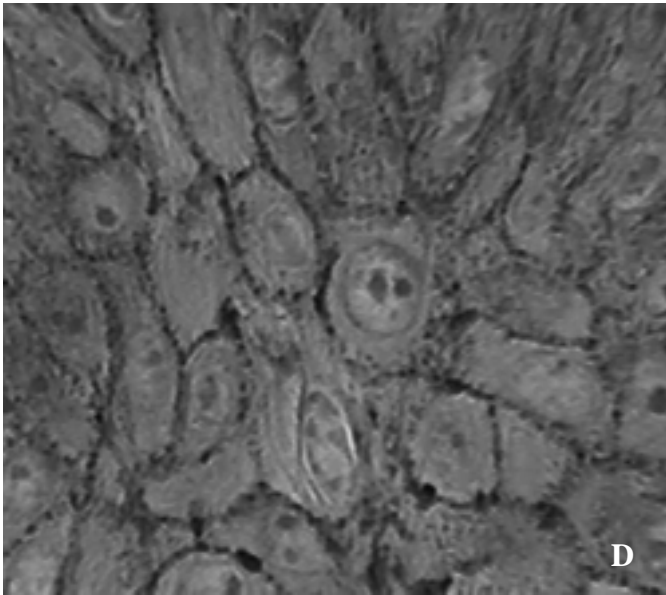
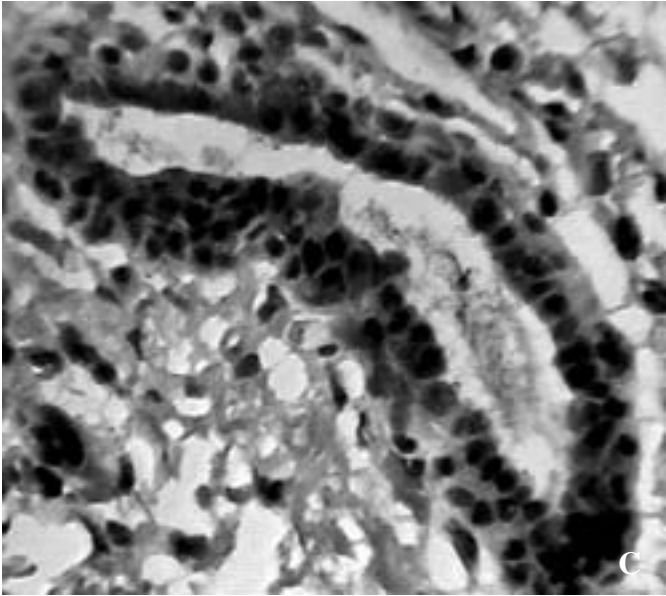
Figura A - Fotomicrografia mostrando a expressão do P53 pela marcação imuno-histoquímica em preparados histológicos de carcinoma mamário de cadela. Notar a coloração marrom-dourada dos núcleos. Aumento 40X

Figura B - Fotomicrografia mostrando a expressão do Ki-67 pela marcação imuno-histoquímica em preparados histológicos de carcinoma mamário de cadela. Notar a coloração marrom-dourada dos núcleos. Aumento 40X

Figura C - Fotomicrografia mostrando a expressão do PCNA pela marcação imuno-histoquímica em preparados histológicos de carcinoma mamário de cadela. Notar a coloração marrom-dourada dos núcleos. Aumento 40X

Figura D - Fotomicrografia mostrando a expressão da E-caderina pela marcação imuno-histoquímica em preparados histológicos de carcinoma mamário de cadela. Notar a marcação de membrana citoplasmática. Aumento 100X





Correspondência

Debora Aparecida Pires Campos Zuccari
Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 - CEP 15090-000
Fone: (17) 3201 5885
e-mail: debora.zuccari@famerp.br
