

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**VALOR PROGNÓSTICO DA IMUNOEXPRESSÃO DE P-53 EM NEOPLASIAS
MAMÁRIAS DE CADELAS**

Thaís de Almeida Moreira

Médica Veterinária

UBERLÂNDIA

Fevereiro de 2018

THAÍS DE ALMEIDA MOREIRA

**VALOR PROGNÓSTICO DA IMUNOEXPRESSÃO DE P-53 EM NEOPLASIAS
MAMÁRIAS DE CADELAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Saúde Animal

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi

UBERLÂNDIA

Fevereiro de 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M838v Moreira, Thaís de Almeida, 1987
2018 Valor prognóstico da imunoexpressão de p53 em neoplasias
mamárias de cadelas / Thaís de Almeida Moreira. - 2018.
48 f. : il.

Orientadora: Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.132>
Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Câncer em cão - Teses. 3. Animais
domésticos - Doenças - Teses. 4. Mamas - Câncer - Teses. I. Medeiros-
Ronchi, Alessandra Aparecida. II. Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois sem Ele nada seria possível.

Aos meus familiares, em especial à minha mãe, pela dedicação e por sonharem comigo e me mostrarem que o estudo é o melhor caminho.

Ao meu esposo Thales, por todo carinho, amor e apoio na minha vida profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado.

À professora Alessandra, minha orientadora, exemplo profissional e pessoal. Obrigada pelos ensinamentos, conselhos, amizade, confiança e oportunidade de trabalhar ao seu lado.

À equipe do Laboratório de Patologia Animal, residentes e estagiários que estiveram comigo nessa jornada, obrigada pelo apoio, em especial aos professores Márcio, Matias e Rodrigo.

Aos que amigos adquiridos durante meu período de residência, Nicolle, Rafael, Lígia e Arlinda, pelo apoio e amizade.

Às equipes de clínica e cirurgia do Hospital Veterinário (HV – UFU), pelo apoio e colaborações prestadas.

À direção do Hospital Veterinário, em especial ao diretor Amado Júnior, que permitiu a realização dos procedimentos necessários.

A todos vocês, muito obrigada.

RESUMO

O tumor de mama é o tipo de neoplasia mais importante em cadelas intactas. Mutações no gene supressor de tumor p53 levam à superexpressão da proteína em neoplasias mamárias e tem sido associado a pior prognóstico em mulheres, porém seu valor prognóstico em cadelas portadoras de tumores mamários é controverso. Objetivou-se avaliar a expressão de p53 em tumores mamários caninos (TMC) e verificar sua correlação com características clinicopatológicas, tumorais e sobrevida total (ST), avaliando ainda o intervalo livre de doença (ILD) e o tempo de desenvolvimento de tumor em mama remanescente (TDTMR) de cadelas submetidas à mastectomia parcial. Cem cadelas foram acompanhadas por um período mínimo de dois anos. A determinação da expressão de p53 foi realizada por meio de imunohistoquímica, utilizando a técnica de estreptoavidina-biotinaperoxidase. Foram consideradas positivas amostras com mais de 10% de células neoplásicas marcadas, avaliadas quanto à porcentagem e intensidade de marcação. 96% (96/100) dos tumores eram malignos. Verificou-se superexpressão de p53 em 65% (65/100) dos tumores. Notou-se correlação entre superexpressão de p53 e subtipo histológico ($p=0,017$), sendo os carcinomas tubular e complexo os que mais frequentemente expressaram. Verificou-se maior escore de marcação e maior intensidade de marcação em neoplasias de alto grau histológico. Cadelas com tumores mamários que superexpressaram p53 apresentaram menor ST ($p=0,012$), porém não houve correlação entre expressão de p53 e ILD ($p=0,441$) e TDTMR ($p=0,240$). A idade da cadela ao diagnóstico foi um fator que também influenciou a ST, sendo pior em cadelas com mais de oito anos ($p=0,023$). Este estudo demonstrou que a superexpressão de p53 em neoplasias mamárias de cadelas está associada a pior sobrevida e deve ser considerada como importante fator prognóstico.

Palavras-chave: P53, sobrevida, canina, tumor de mama.

ABSTRACT

Breast cancer is the most important neoplasm in intact bitches. Mutations in p53 tumor suppressor gene lead to overexpression of p53 protein in mammary neoplasms and have been associated a worse prognosis in women, but its prognostic value in canine mammary tumors (CMT) is controversial. The aim of this study was evaluate the p53 expression in CMT and verify its correlation with clinical, pathological, tumor features and overall survival (OS), also evaluating the disease free interval (DFI) and tumor development interval in the breast remnant (TDIBR) of bitches submitted to partial mastectomy. One hundred bitches were followed up for a minimum of two years. Determination of p53 expression was performed by immunohistochemistry using the streptavidin-biotin-peroxidase technique. Samples with more than 10% of labeled neoplastic cells were considered positive, which were also evaluated for percentage and marking intensity. P53 overexpression was found in 65% (65/100) of the tumors. There was a correlation between p53 overexpression and histological subtype, which was higher in tubular and complex carcinomas ($p = 0.017$), and a higher marker score and higher labeling intensity was observed in high histological grade neoplasms ($p = 0.023$ and $p = 0.030$, respectively). However, there was no correlation between p53 expression and DFI ($p = 0.441$) and TDIBR ($p = 0.240$). The age of the dog at diagnosis was a factor that also influenced OS, being worse in bitches with more than eight years ($p = 0.023$). This study demonstrated that the p53 overexpression in CMT should be considered as an important prognostic factor, related to a worse survival.

KEYWORDS: p53, survival, canine, breast cancer.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	9
2.1. Anatomia da glândula mamária da cadela.....	9
2.2. As neoplasias mamárias em cadelas.....	10
2.3. Epidemiologia.....	11
2.4. Diagnóstico.....	11
2.5. Classificação e gradação histológica.....	13
2.6. Fatores prognósticos.....	15
2.7. P53 nas neoplasias mamárias.....	15
2.8. Tratamento.....	18
REFERÊNCIAS.....	19

CAPÍTULO 2

Valor prognóstico da expressão imunohistoquímica de p-53 em tumores mamários de cadelas.....	24
--	----

1. INTRODUÇÃO

Tumores mamários caninos (TMC) representam 50 a 70% de todos os tumores que acometem fêmeas caninas intactas (GOLDSCHMIDT et al., 2017), sendo reportada taxa de malignidade de aproximadamente 50% (FOALE E DEMETRIUOU, 2011; SALAS et al., 2015).

Assim, por se constituir em importante problema de saúde nesta população, além da cadela ser considerada modelo para estudo devido às similaridades clínicas e moleculares dos TMC com as neoplasias mamárias em mulheres (QUEIROGA et al., 2011), pesquisas envolvendo a busca por marcadores moleculares que auxiliem na determinação do prognóstico dos TMC tem se intensificado nos últimos anos (TONG et al., 2016). Dentre esses marcadores, a P53 assume importância devido seu papel na manutenção da estabilidade genômica, regulando o ciclo celular e induzindo a apoptose (YAMAMOTO et al., 2014).

O gene p53 é um dos genes supressores de tumores e a perda das suas funções inibitórias de crescimento contribui para a transformação maligna e/ou progressão tumoral (PERKINS; VANDE WOUDE, 1993). A mutação do gene p53 prejudica a habilidade da célula em detectar danos no DNA e resulta na superexpressão da proteína p53 no núcleo das células tumorais, podendo ser detectada por meio da imunohistoquímica. Já em sua forma inalterada, a p53 não se acumula nas células, pois possui uma meia-vida curta (cerca de 20 a 30 minutos), não sendo detectável por este método (HAINAUT; WIMAN, 2007).

Em mulheres com neoplasia mamária, já foi verificada correlação entre superexpressão da p53 e estadiamento TNM, envolvimento de múltiplos órgãos, maior taxa de recorrência e menor sobrevida (YANG et al., 2013; YAMAMOTO et al., 2014). Já em cadelas, poucos estudos tem avaliado o valor prognóstico da superexpressão dessa proteína, além de apresentarem resultados controversos, por vezes com estudos demonstrando relação entre superexpressão de p53 e maior agressividade tumoral (DOLKA et al., 2016) e, em outros, esta relação não sendo verificada (LEE et al., 2004; ZUCCARI et al., 2005).

As controvérsias apresentadas quanto ao valor prognóstico da p53 pode estar relacionada a fatores como: realização de avaliações com pequeno número pacientes, acompanhamento clínico por curto período de tempo, avaliação em conjunto de

diferentes subtipos e estágios tumorais e uso de diferentes métodos para avaliação da p53 (BERTHEAU et al., 2013).

Assim, os objetivos deste estudo foram: avaliar a expressão de p53 nos TMC através da imunohistoquímica e verificar sua correlação com características clinicopatológicas, tumorais e sobrevida total (ST), avaliando ainda o intervalo livre de doença (ILD) e tempo de desenvolvimento de tumor em mama remanescente (TDTMR) de cadelas submetidas à mastectomia parcial.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Anatomia da glândula mamária da cadela

A cadela possui cinco pares de glândulas mamárias, dispostas de forma simétrica e lateral à linha média, que se estendem da parte ventral do tórax à região inguinal (TYLER, 2002). São denominadas e numeradas conforme sua localização anatômica. Os pares craniais são denominados torácicos, os seguintes abdominais e os últimos inguinais (DAVIDSON e STABENFELDT, 2014).

A numeração das glândulas mamárias da cadela segue o sentido craniocaudal. O número 1 corresponde às glândulas torácicas craniais (T1), o número 2 às torácicas caudais (T2), o 3 às abdominais craniais (A3), o 4 às abdominais caudais (A4) e o 5 às inguinais (I). As glândulas mamárias abdominais caudais e inguinais são as que apresentam maior quantidade de tecido glandular, sendo, portanto, mais volumosas. Algumas cadelas podem apresentar apenas quatro pares de glândulas mamárias e cerca de 50% não possui uma das glândulas abdominais craniais (TYLER, 2002; REESE et al., 2016).

Cada glândula mamária é constituída por lóbulos de glândulas túbulo-alveolares compostas. São separados entre si por septos de tecido conjuntivo denso e tecido adiposo. A secreção proveniente de cada lóbulo é drenada para o ducto interlobular e depois para o ducto galactóforo. Cada mamilo possui em média 20 aberturas distintas, relacionadas ao sistema de ductos e glândulas (TYLER, 2002). As alterações características do ciclo estral da cadela levam ao crescimento e proliferação da glândula mamária em cada ciclo, mesmo quando não há procriação (REESE et al., 2016).

Quanto às características celulares, os ductos galactóforos são revestidos por uma dupla camada de células epiteliais cúbicas ou cilíndricas baixas. Os ductos

interlobulares apresentam epitélio simples cilíndrico, podendo ser cúbico no caso dos ductos intralobulares (DAVIDSON e STABENFELDT, 2014).

As glândulas mamárias de carnívoros recebem irrigação adicional dos ramos mamários da artéria torácica lateral. O linfonodo axilar recebe a drenagem linfática das glândulas torácicas (1 e 2), e o linfonodo inguinal superficial recebe a drenagem das glândulas 4 e 5. Os linfáticos da terceira glândula mamária comumente drenam através do linfonodo axilar, mas também podem drenar caudalmente. Uma boa compreensão do fluxo linfático é clinicamente importante em casos de neoplasias mamárias (FOALE e DEMETRIOU, 2011; REESE et al., 2016).

2.2 As neoplasias mamárias em cadelas

Os TMC possuem etiologia multifatorial, podendo estar correlacionados a fatores genéticos, nutricionais, ambientais, infecciosos e principalmente, hormonais (RÊGO et al., 2015).

A frequente proliferação e subsequente regressão das glândulas mamárias da cadela em cada ciclo estral pode ser um fator de predisposição ao desenvolvimento dos TMC (REESE et al., 2016). Neste sentido, as neoplasias mamárias em cadelas são quase 100% preveníveis quando estas são castradas antes do primeiro ciclo estral, podendo também ter a incidência consideravelmente reduzida com ovariectomia (OSH) (antes dos 2,5 anos de idade) ou anteriormente aos quatro primeiros períodos estrais (FORD e MAZZAFERRO, 2013; KRISTIANSEN et al., 2016).

A maioria dos TMC ocorre primariamente nas glândulas caudais, possivelmente devido a maior quantidade de tecido glandular, sendo comum (50 a 60%) a ocorrência de tumores múltiplos (SORENMO et al., 2011). Ademais, é importante considerar que tumores mamários múltiplos geralmente não são do mesmo subtipo histológico, tendo, portanto, comportamento biológico diferente (SOLANO-GALLEGO, 2012).

Geralmente, quando as cadelas portadoras de neoplasia mamária são apresentadas para cuidados veterinários, essas neoplasias já possuem longo tempo de evolução, o que é desfavorável para a sobrevivência dessas pacientes (SORENMO et al., 2011; SORENMO et al., 2013; CÔTÉ, 2015).

Tendo em vista as similaridades apresentadas pelas neoplasias mamárias em cadelas e mulheres, a cadela tem sido um modelo para estudo deste câncer em humanos,

tornando essas pesquisas de elevada importância (BURKE et al., 2012; TONG et al., 2016).

2.3 Epidemiologia

A incidência de neoplasias mamárias em cadelas varia em decorrência da região de origem do estudo, já que são diferentes as características apresentadas por cada população. A incidência dos TMC nos Estados Unidos é menor que em muitos outros países, devido prática comum da OSH em animais jovens (GOLDSCHMIDT et al., 2017). Já no Brasil, apresentam elevada incidência (SORENMO et al., 2011; SORENMO et al., 2013).

Atualmente, são descritas por corresponderem a 50-70% dos tumores que ocorrem nas fêmeas intactas, sendo malignas em 50% dos casos (GOLDSCHMIDT et al., 2017).

Machos apresentam incidência menor ou igual a 1% se comparado às fêmeas, e geralmente ocorrem associados a anormalidades funcionais que induzem ginecomastia, como tumores funcionais das células de Sertoli (RIBAS et al., 2012).

Dentre as características epidemiológicas, a raça e a idade são fatores envolvidos na ocorrência dessas neoplasias (SORENMO et al., 2013). Cadelas de meia idade ou idosas (com mais de sete anos) são as mais afetadas, sendo nove e dez anos as idades médias de acometimento mais reportadas (ZUCCARI et al., 2005; SORENMO et al., 2011; RIBAS et al., 2012; SILVA et al., 2014).

As raças que demonstram maior incidência são: Poodle, Pastor Alemão, Cocker Spaniel, Maltês, Yorkshire e Dachshund (SORENMO et al., 2011; DOBSON, 2013; CÔTÉ, 2015). Entretanto, é importante considerar que a incidência dos TMC nas diferentes raças pode variar em relação à região do estudo (DOBSNON, 2013). Uma maior ocorrência de TMC em cães sem raça definida (SRD) comparada a cães de raças puras pode ser observada em estudos no Brasil (RIBAS et al., 2012; CALDAS et al., 2016; GUNDIM et al., 2016).

Quanto ao porte do cão, diferentes observações são relatadas. Segundo Goldschmidt et al. (2017) os TMC tendem a ocorrer mais frequentemente em animais de raças puras de pequeno porte. Já nos estudos realizados por Peña et al. (2012) e Dolka et al. (2016) foi verificada maior ocorrência de TMC em cadelas de grande porte, sendo ainda, contatada neste último, relação com a expressão de p53.

2.4 Diagnóstico

O diagnóstico dos TMC envolve a realização de minuciosas avaliações clínica, citopatológica e histopatológica, as quais tem o objetivo de predizer o comportamento biológico do tumor com a maior acurácia possível (SOLANO-GALLEG0, 2012). Informações referentes ao histórico da paciente, quanto a ciclo reprodutivo, uso de progestágenos, abortos, pseudogestação e outras lesões que tenham sido observadas pelo proprietário, devem ser registradas (CÔTE, 2015).

Alterações hematológicas relacionadas à neoplasia mamária podem ser observadas, sendo anemia normocítica normocrômica e leucocitose neutrofílica as alterações mais frequentes em casos de estágio avançado da doença (III, IV ou V) (SILVA et al., 2014).

No exame físico, as glândulas mamárias devem ser palpadas individualmente e inspecionadas quanto à presença de tumores, inflamação ou hipertrofia (FORD e MAZZAFERRO, 2013). Os linfonodos axilares e inguinais também devem ser palpados a procura de alterações em seu tamanho, consistência e mobilidade (SORENMO et al, 2013; CÔTÉ, 2015). Tendo em vista a drenagem linfática da cadeia mamária, ao exame clínico os linfonodos regionais devem ser explorados, fazendo-se importante também a realização de exames de imagem (FORD e MAZZAFERRO, 2013).

Os nódulos mamários devem ser avaliados quanto ao tamanho, formato, consistência, presença de aderências (subcutânea ou muscular) ou ulcerações (BURKE et al., 2012). A prévia realização de exame citopatológico em lesões mamárias nodulares é importante por permitir uma conduta terapêutica direcionada, uma vez que permite a distinção entre cistos mamários, inflamação/infecção e neoplasias, auxiliando, ainda, na suspeita de malignidade ou benignidade da lesão (SOLANO-GALLEG0, 2012; CASSALI et al., 2013; CASSALI et al., 2017).

A aspiração de cistos mamários revela um material líquido de coloração que pode variar de esverdeada a amarronzada, apresentando microscopicamente, células espumosas (células epiteliais secretoras descamadas) e macrófagos contendo pigmento. As lesões hiperplásicas e displásicas incluem a hiperplasia unilobular e multilobular, adenose e epiteliôse, sendo caracterizadas pela proliferação do epitélio secretor ou

ductal das células mioepiteliais. Citologicamente, são difíceis de serem distinguidas das neoplasias benignas (SOLANO-GALLEGO, 2012).

Tendo em vista a drenagem linfática da cadeia mamária, ao exame clínico os linfonodos regionais devem ser explorados, fazendo-se importante também, realização de exames de imagem (FORD e MAZZAFERRO, 2013). Ainda, a aspiração de linfonodos regionais alterados pode auxiliar no diagnóstico de metástase, já que em tumores malignos que metastatizam, células tumorais localizadas nas glândulas abdominais caudais e inguinais são drenadas para os linfonodos inguinais e podem atingir os pulmões via ducto torácico (SOLANO-GALLEGO, 2012; FORD e MAZZAFERRO, 2013).

Neste sentido, é imprescindível a realização de exame radiográfico torácico, bem como exame ultrassonográfico da região abdominal, a qual pode revelar a presença de metástases para órgãos dessa cavidade, ou demais alterações importantes, como esplenomegalia ou hepatomegalia (RIBAS et al., 2012).

O exame histopatológico é geralmente realizado após exérese cirúrgica. Tendo em vista que em casos de múltiplos tumores mamários, cada um deles pode apresentar um subtipo histológico diferente, para o exame, todos os nódulos devem ser coletados e avaliados (SOLANO-GALLEGO, 2012; SORENMO et al., 2013).

Análises imunohistoquímicas por vezes podem ser requeridas, seja para confirmação da origem da neoplasia, para determinação da expressão de receptores para estrógeno e progesterona, ou como auxiliar na determinação do prognóstico (CASSALI et al., 2013; CASSALI et al., 2017).

2.5 Classificação e gradação histológica

As neoplasias da glândula mamária são classificadas quanto ao comportamento em benignas ou malignas. Histologicamente, a diferenciação entre tumores malignos e benignos se baseia no tipo, arranjo, invasão neoplásica, pleomorfismo e presença ou ausência de componentes mesenquimais não neoplásicos (SORENMO et al., 2013).

Propostas de classificação para os TMC têm sido descritas a fim de contribuir com a avaliação prognóstica, já que por vezes o subtipo histológico demonstra-se correlacionado a uma pior sobrevida (SOLANO-GALLEGO, 2012; RASOTTO et al., 2017).

Ao longo dos anos, essa classificação tem sido aprimorada a fim de facilitar sua aplicação. Em 1974, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou a primeira classificação histológica internacional de tumores dos animais domésticos, incluindo neoplasias e displasias da glândula mamária, baseada nas classificações propostas em três estudos anteriores (MISDORP et al., 1971; MISDORP et al., 1972; MISDORP et al., 1973) sofrendo modificações posteriores, baseadas em Misdorp et al. (1999).

Em 2011, baseando no descrito pela OMS, uma proposta de atualização da classificação dos TMC foi realizada por Cassali et al. (2011), sendo reavaliada em 2013 (Cassali et al., 2013). Ainda, Goldschmidt et al. (2011) também realizaram uma proposta de classificação para os TMC baseada na classificação da OMS de 1974 e 1999, sendo as neoplasias primariamente divididas em: epitelial maligna, tipos especiais de neoplasia epitelial maligna, mesenquimais malignas, mista maligna, hiperplasia/displasia, neoplasias do teto e hiperplasia ou displasia do teto (melanose) (GOLDSCHMIDT et al., 2011).

Atualmente, Goldschmidt et al. (2017) classifica as alterações mamárias caninas em hiperplasia/displasia, neoplasias benignas (adenoma – simples e complexo, adenoma ductal, fibroadenoma, mioepitelioma e tumor misto benigno) e malignas (epiteliais, mesenquimais e mistas – epiteliais e mesenquimais). As neoplasias mamárias epiteliais malignas são as mais frequentes, podendo ser citadas dentre elas o carcinoma *in situ*, carcinoma simples (tubular, tubulopapilar, cístico-papilar e cribiforme), complexo, micropapilar, sólido, comedocarcinoma, anaplásico, em tumor misto, mioepitelioma maligno, ductal, intraductal.

A gradação histológica possui significativa correlação com a agressividade tumoral. O sistema Nottingham, também denominado método de gradação histológica de Scarff-Bloom-Richardson (SBR) modificado por Elston e Ellis (1991), foi o primeiro descrito para gradação histológica de tumores de mama, baseando-se na formação tubular, no pleomorfismo nuclear e no índice mitótico. Com base nesse sistema de classificação inicialmente proposto, Cassali et al. (2013) descreveram a determinação do grau histológico da seguinte forma: formação tubular (1 ponto: mais que 75% do tumor constituído por túbulos, 2 pontos: entre 10% e 75% de formação tubular e 3 pontos: túbulos em menos de 10% do tumor); no pleomorfismo nuclear (1 ponto: núcleo pequeno e regular, 2 pontos: moderada variação nuclear e aumento de tamanho e 3 pontos: grande variação no tamanho e formato); e no número de mitoses avaliado em objetiva de 40x em 10 campos (1 ponto: 0-8 mitoses, 2 pontos: 9-16, e 3 pontos: mais de

17 mitoses). Assim, o grau é determinado em I quando se somam de 3 a 5 pontos, em grau II para 6-7 pontos e grau III para 8-9 pontos. A gradação histológica segundo Goldschmidt et al. 2017 segue os mesmos parâmetros, diferindo apenas quanto a avaliação do número de mitoses (1 ponto: 0-9; 2 pontos: 10-19 e 3 pontos: ≥ 20 mitoses).

Tumores de baixo grau histológico estão associados a período livre de doença mais longo e com menor taxa de recorrência, quando comparados a tumores de alto grau (FOALE E DEMETRIOU, 2011). Estudos relataram maior taxa de ocorrência de metástases em carcinomas mamários grau III, comparados aos de grau I e II (DIAS et al., 2016; DOLKA et al., 2016; GUNDIM et al., 2016).

2.6 Fatores prognósticos

Os fatores prognósticos podem ser definidos como as várias características clínicas, patológicas e biológicas apresentadas pelos indivíduos e seus tumores, que permitem realizar uma previsão da evolução clínica e do tempo de sobrevida do paciente após a cirurgia (BENAVENTE et al., 2016). Um marcador é considerado preditivo quando útil na seleção de pacientes para tratamentos específicos e individualizados (DOLKA et al., 2016).

Cães com tumores menores que três centímetros de diâmetro apresentam melhor prognóstico, comparado a cães com tumores de diâmetro maior (FOALE e DEMETRIOU, 2011; COTÉ, 2015; CALDAS et al., 2016). Relata-se um tempo médio de sobrevida de 22 meses para cães com tumores malignos menores que três centímetros, e de 10 meses para cães com neoplasia maligna maior que cinco centímetros (FOALE e DEMETRIOU, 2011).

Em menor grau, obesidade também pode contribuir para o desenvolvimento dos TMC (FORD e MAZZAFERRO 2013; SORENMO et al., 2013). O sobrepeso ou obesidade em cadelas está associado à ocorrência de TMC em idade mais jovem com precoce invasão linfática (LIM et al., 2015). Alguns estudos têm sugerido mecanismos relacionados à ligação entre obesidade e tumorigênese, sendo eles: efeito de adipocinas (LORINCZ e SUKUMAR, 2006), presença de mediadores inflamatórios e estrogênio local produzido dentro dos tecidos adiposos e do próprio tumor via atividade da enzima aromatase (SIMPSON e BRONW, 2013).

O uso de progestágenos e histórico de pseudogestação são fatores relatados por favorecer a formação de tumores mais agressivos (SOENMO et al, 2013; DAVIDSON

e STABENFELDT, 2014). Por outro lado, a OSH precoce (antes do primeiro cio) reduz consideravelmente (99,5%) o risco de desenvolvimento de neoplasia mamária (GOLDSCHMIDT et al., 2017). Isso se deve a influencia de altos níveis de estrogênio e progesterona contribuírem para o surgimento desses tumores (SORENMO et al, 2013; CÔTÉ, 2015), com expressão de receptores para esses hormônios na maioria dos TMC e redução significativa dessa expressão após OSH (MAINENTI et al., 2014).

A definição do estágio clínico possibilita a determinação da extensão do tumor contribuindo para o estabelecimento do prognóstico e tratamento adequado (SORENMO et al., 2011; SORENMO et al., 2013; GUNDIM et al., 2016). O estadiamento clínico é determinado de acordo com o sistema TNM proposto pela OMS para os tumores caninos, sendo T = tamanho do tumor primário, N = estado dos linfonodos regionais e M = presença ou ausência de metástases à distância (Tabela 1) (OWEN, 1980; CASSALI et al., 2013; CASSALI et al., 2017; SORENMO et al., 2013). Tumores de estágio III, IV e V têm sido associados a menor tempo de sobrevida comparado a tumores no estágio I ou II (YAMAGAMI et al., 1996; KARAYANNOPOULOU et al., 2005). Com isso, o estadiamento clínico combinado aos demais fatores prognósticos deve ser considerado na determinação prognóstica dos TMC (YAMAGAMI et al., 1996).

Tabela 1. Estadiamento clínico (TNM) para cadelas com neoplasia mamária (OWEN, 1980 - adaptado).

Estádio	T	N	M
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0	M0
IV	Qualquer T	N1	M0
V	Qualquer T	Qualquer N	M1

*T= tumor/N= linfonodo regional /M= metástase. T1 = tumor < 3 cm, T2 = 3 a 5 cm, T3 = tumor > 5 cm; N1= metástase em linfonodo regional; M1 = metástase à distância.

2.7 P53 nas neoplasias mamárias

O gene p53 (TP53) localiza-se no cromossomo 17 e codifica uma proteína nuclear com peso molecular de 53 kD, chamada de proteína p53. A primeira descrição dessa proteína foi realizada em 1979, detectada ao formar um complexo com o antígeno T do vírus símio (SV-40), sendo referida como uma oncoproteína e, em 1989, como gene supressor de tumor (HAINAUT e WIMAN, 2007).

A p53 é a proteína responsável por inibir o crescimento de células expostas a injúrias químicas ou físicas, incluindo as células neoplásicas, sendo denominada guardião do genoma (HAINAUT e WIMAN, 2007). A atribuição do termo “guardião do genoma” a p53 deve-se à sua função de monitorar a integridade do genoma, atuando como um sensor de danos no DNA e auxiliando o sistema de reparo, influenciando no ciclo celular e induzindo a apoptose (YAMAMOTO et al., 2014). Assim, com a perda da função da p53, uma proliferação anormal celular é favorecida, levando ao desenvolvimento de tumores (HAINAUT e WIMAN, 2007).

Em sua forma inalterada, a p53 não se acumula nas células, pois possui uma meia-vida curta (cerca de 20 a 30 minutos), não sendo detectável por meio de imunohistoquímica. Em contrapartida, sua forma alterada possui uma meia-vida significativamente mais longa, se acumulando no núcleo das células e podendo ser evidenciada por métodos imunohistoquímicos. Dessa forma, a determinação de um imunofenótipo neoplásico realizada através da análise imunohistoquímica, com identificação de antígenos “*in situ*” pode ser de considerável valor prognóstico e terapêutico (VEENA et al., 2014; DOLKA et al., 2016; TONG et al., 2016).

Atualmente, observa-se que aproximadamente 70% dos cânceres humanos possuem uma deficiência na função do gene p53 (BERTHEAU et al., 2013). Com relação às neoplasias mamárias, o gene encontra-se mutado em aproximadamente 30% das mulheres com tumores, com variações nessa frequência dentro dos subtipos histológicos (BURKE et al., 2012; YANG et al., 2016). Assim, nota-se uma maior expressão em tumores com origem em células luminais (54%) que em tumores com origem em células basais (25%) (DUMAI et al., 2013). De forma semelhante, em tumores mamários em cadelas também tem apresentado uma taxa de expressão de cerca de 30% (VEENA et al., 2014; DOLKA et al., 2016).

O papel da p53 com relação à sobrevida das cadelas ainda não é totalmente claro. Ademais, estudos correlacionando a expressão de p53 em CMT com a sobrevida são escassos. Dos realizados, Dolka et al. (2016) não verificaram correlação da superexpressão dessa proteína com a sobrevida. Já Lee et al., (2004) constataram

associação entre a superexpressão de p53 e uma menor sobrevida, com essa superexpressão sendo apenas um fator independente de pior prognóstico para os TMC. As controvérsias apresentadas quanto ao valor prognóstico da p53 pode estar relacionada a fatores como: realização de avaliações com pequeno número de pacientes, acompanhamento clínico por curto período de tempo, avaliação em conjunto de diferentes subtipos e estágios tumorais e uso de diferentes métodos para avaliação da p53 (BERTHEAU et al., 2013).

Dessa forma, pesquisas relacionadas às alterações do gene p53 e sua consequente imunoexpressão nas células tumorais podem auxiliar na avaliação dos TMC, se tornando um elemento com grande valor prognóstico (HAINAUT e WIMAN, 2007).

2.8 Tratamento

A primeira linha de tratamento para tumores mamários é a cirurgia, exceto para o carcinoma inflamatório, o qual deve ser realizado terapia de controle regional (CASSALI et al., 2013; CASSALI et al., 2017). Isso se deve ao fato de serem extremamente agressivos, com a cirurgia não tendo valor no controle ou palição da doença (MACPHAIL, 2015).

Para os demais subtipos histológicos de neoplasias mamárias, a remoção cirúrgica é satisfatória, sendo curativa para a maioria dos tumores de estágio I, não invasivos e bem diferenciados (CASSALI et al., 2013, CASSALI et al., 2017). Além disso, a excisão permite o diagnóstico histológico, e mesmo quando não curativa, contribui por melhorar a qualidade de vida ou alterar a progressão da doença (MACPHAIL, 2015).

A escolha da técnica cirúrgica irá depender do tamanho do tumor, da consistência, da localização e do estado da paciente. Quando a massa apresenta diâmetro de até um centímetro, firme e não aderida às estruturas, é indicada nodulectomia simples total. Entretanto, se a histopatologia revelar malignidade, uma cirurgia futura mais extensa é recomendada. A abordagem para massas maiores que um centímetro, envolve a remoção de acordo com a drenagem linfática. A sobrevida não é influenciada pela técnica utilizada, a não ser que seja feita remoção tumoral incompleta (FOALE e DEMETRIOU, 2011; HORTA et al., 2014; MACPHAIL, 2015; DIAS et al., 2016).

Quando a excisão completa não é possível em um único procedimento, uma nova cirurgia deve ser realizada, aguardando o tempo de três a quatro semanas após a primeira para que haja adequado relaxamento e recuperação da pele. A OSH pode ser realizada momentos antes da mastectomia, para evitar que células tumorais atinjam a cavidade abdominal (FORD e MAZZAFERRO, 2013; CÔTE, 2015; MACPHAIL, 2015).

Recentemente, em medicina veterinária, observa-se que o emprego da quimioterapia adjunta pós-cirúrgica pode ser benéfica para controle de alguns tumores malignos. Em alguns casos a radioterapia e hormonioterapia também podem ser consideradas como terapia complementar no tratamento dos TMC (CASSALI et al., 2017; GOLDSCHMIDT et al., 2017)

REFERÊNCIAS

BERTHEAU, P.; LEHMANN-CHE, J.; VARNA, M.; DUMAY, A.; POIROT, B.; PORCHER, R.; TURPIN, E.; PLASSA, L.F.; ROQUANCOURT, A.; BOURSTYN, E.; CREMOUX, P.; JANIN, A.; GIACCHETTI, S.; ESPIÉ, M.; THÉ, H. P53 in breast cancer subtypes and new insights into response to chemotherapy. **The Breast**, v.22, p.27-29, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2013.07.005>

BURKE, H. B.; HUTTER, R. V. P.; HENSON, D. E. Breast carcinoma. In: PAUL HERMANEK, P.; GOSPODAROWICZ, M, K.; HENSON, D. E.; HUTTER, R. V. P.; SOBIN, L. (Eds). **Prognostic factors in cancer**. Springer Science & Business Media: New Delhi, 2012, cap.8, 290 p.

CALDAS, S.A.; MIRANDA, I.C.; BRITO, M.F.; NOGUEIRA, V.A.; CID, G.C.; COSTA, S.Z.R.; FRANÇA, T.N.; PINTO, L.F. Aspectos clínico-patológicos das neoplasias mamárias em cadelas (Canis familiaris)*. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.38, supl.2, p.81-85, 2016.

CASSALI, G.D. et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.4, n.2, p.153-180, 2011.

CASSALI, G.D. et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 7, n. 2, p.38-69, 2013.

CASSALI, G.D.; FERREIRA, E.; CAMPOS, C.B. **Patologia mamária canina - do diagnóstico ao tratamento**. 1ª ed., MedVet, São Paulo, 2017.

CÔTÉ, E. Mammary gland neoplasia. In: **Clinical Veterinary Advisor. Dogs and cats**. 3rd edition. St Louis: Mosby, Elsevier. 2015.

- DAVIDSON, A.P.; STABENFELDT, G.H. A glândula mamária. In: Klein, B.G. **Cunningham tratado de fisiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 5^a ed., cap.39, p.439-448, 2014.
- DIAS, M.L.M.; ANDRADE, J.M.L.; CASTRO, M.B.; GALERA, P.D. Survival analysis of female dogs with mammary tumors after mastectomy: epidemiological, clinical and morphological aspects. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.36, n.3, p.181-186, 2016. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016000300006>
- DOBSON, J.M. Breed-Predispositions to Cancer in Pedigree Dogs. **ISRN Veterinary Science**, v.1, p.1-23, 2013.
- DOLKA, I.; KRÓL, M.; SAPIERZYŃSKI, R. Evaluation of apoptosis-associated protein (Bcl-2, Bax, cleaved caspase-3 and p53) expression in canine mammary tumors: An immunohistochemical and prognostic study. **Research in Veterinary Science**, v.105, p.124-33, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.02.004>
- DUMAI, A.; FEUGEAS, J.P.; WITTMER, E.; LEHMANN-CHE, J.; BERTHEAU, P.; ESPIE, M.; PLASSA, L.F.; COTTU, P.; MARTY, M.; ANDRE, F.; SOTIRIOU, C.; PUSZTAI, L.; THÉ, H. Distinct tumor protein P53 mutants in breast cancer subgroups. **International Journal of Cancer**, v.132, p.1227–1231, 2013. <https://doi.org/10.1002/ijc.27767>
- ELSTON, C.W.; ELLIS, I.O. Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**, v.19, p.403-410, 1991. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x>
- FOALE, R.; DEMETRIOU, J. **Oncologia em pequenos animais**. Série clínica veterinária na prática. 1^a ed. São Paulo: Elsevier, 2011.
- FORD, R.B.; MAZZAFERRO, E.M. Emergências oncológicas. In: KIRK, R.W.; BISTNER, S, I. **Manual de procedimentos veterinários e tratamento emergencial**. 9^a ed. São Paulo: Elsevier, 2013.
- LIM, H.I.; IM, K.S.; KIM, N.H.; KIM, H.W.; SHIM, J.I; SUR, J.H. Obesity, expression of adipocytokines, and macrophage infiltration in canine mammary tumors. **The Veterinary Journal**, v. 203 p.326–331, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.01.005>
- LORINCZ, A.M., SUKUMAR, S. Molecular links between obesity and breast cancer. **Endocrine-Related Cancer**, v.13, p.279–292, 2006. <https://doi.org/10.1677/erc.1.00729>
- GOLDSCHMIDT, M.; PEÑA, L.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V. Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v.48, n.1, p.117-131, 2011. <https://doi.org/10.1177/0300985810393258>
- GOLDSCHMIDT, M.H.; PEÑA, L.; ZAPPULLI, V. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN, D.J. (Ed.). **Tumors in domestic animals**. 5 ed., Ames, Iowa : John Wiley & Sons Inc., 2017, p.723-765.

GUNDIM, L.F.; ARAÚJO, C.P.; BLANCA, W.T.; GUIMARÃES, E.C.; MEDEIROS, A.A. Clinical staging in bitches with mammary tumors: Influence of type and histological grade. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v.80, p.318–322, 2016.

HAINAUT, P.; WIMAN, K.G. **25 years of P53 research**. 1ed., Berlim: Springer, 2007.

HORTA, R.S.; LAVALLE, G.E.; CUNHA, R.M.C.; MOURA, L.L.; ARAÚJO, R.B.; CASSALI, G.D. Influence of surgical technique on overall survival, disease free interval and new lesion development interval in dogs with mammary tumors. **Advances in Breast Cancer Research**, v.3, p.38-46, 2014. <https://doi.org/10.4236/abcr.2014.32006>

KARAYANNOPOULOU, M.; KALDRYMIDOU, E.; CONSTANTINIDIS, T.C.; DESSIRIS, A. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: Application of a human grading method. **Journal of Comparative Pathology**, v.133, p.246–252, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2005.05.003>

KRISTIANSEN, V.M.; PEÑA, L.; DÍEZ CÓRDOVA, L.; ILLERA, J.C.; SKJERVE, E.; BREEN, A.M.; COFONE, M.A.; LANGELAND, M.; TEIGE, J.; GOLDSCHMIDT, M.; SORENMO, K.U. Effect of ovariohysterectomy at the time of tumor removal in dogs with mammary carcinomas: a randomized controlled trial. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 30, p.230-241, 2016. <https://doi.org/10.1111/jvim.13812>

MACPHAIL, C.M. Cirurgias do sistema reprodutivo e genital. In: FOSSUM, T.W. **Cirurgia de pequenos animais**. Elsevier: Rio de Janeiro, 4ed, 2015, p.809-813.

MAINENTI, M.; RASOTTO, R.; CARNIER, P.; ZAPPULLI, V. Oestrogen and progesterone receptor expression in subtypes of canine mammary tumours in intact and ovariectomised dogs. **The Veterinary Journal**, v. 202, n.1, p.62-68, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.06.003>

PEÑA, L.; ANDRÉS, P.J.; CLEMENTE, M.; CUESTA, P.; PÉREZ-ALENZA, M.D. Prognostic value MISDORP, W.; COTCHIN, E.; HAMPE, J.F.; JABARA, A.G.; VON SANDERSLEBEN, J. Canine malignant mammary tumours: I. Sarcomas. **Veterinary Pathology**, v.8, n.99, p.117, 1971.

MISDORP, W.; COTCHIN, E.; HAMPE, J.F.; JABARA, A.G.; VON SANDERSLEBEN, J. Canine malignant mammary tumours: II. Adenocarcinomas, solid carcinomas and spindle cell carcinomas. **Veterinary Pathology**, v.9, p.447–470, 1972. <https://doi.org/10.1177/030098587200900605>

MISDORP, W.; COTCHIN, E.; HAMPE, J.F.; JABARA, A.G.; VON SANDERSLEBEN, J. Canine malignant mammary tumours: III. Special types of carcinomas, malignant mixed tumours. **Veterinary Pathology** 10:241–256, 1973. <https://doi.org/10.1177/030098587301000307>

OWEN, L.N. TNM classification of tumors in domestic animals. **World Health Organization**, v.149, Geneva, Switzerland edition, 1980. of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with two-year

follow-up: relationship with clinical and histological characteristics. **Veterinary Pathology**, v.50, n.1, p.94-105, 2012.

QUEIROGA, F.L.; RAPOSO, T.; CARVALHO, M.I.; PRADA, J.; PIRES, I. Canine mammary tumors as a model to study human breast cancer: most recent findings. **In vivo**, v.25, n.3, p.455-465, 2011.

RASOTTO, R.; BERLATO, D.; GOLDSCHMIDT, M.H.; ZAPPULLI, V. Prognostic significance of canine mammary tumor histologic subtypes: an observational cohort study of 229 cases. **Veterinary Pathology**, v.54, n.4, p.571-578, 2017. <https://doi.org/10.1177/0300985817698208>

RIBAS, C.R.; DORNBUSCH, P.T.; FARIA, M.R.; WOUK, A.F.P.F.; CIRIO, S.M. **Archives of Veterinary Science**. Alterações clínicas relevantes em cadelas com neoplasias mamárias estadiadas, v. 17, n.1, p.60-68, 2012.

REESE, S.; BUDRAS, K.-D.; MÜLLING, Chr.; BRAGULLA, H.; KÖNIG, H.E. Tegumento Comum. In: KÖNIG, H.E.; LIEBICH, H-G. **Anatomia dos animais domésticos – Texto e atlas colorido**. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2016, p. 615-630.

RÊGO, M.S.A.; FUKAHORI, F.L.P.; DIAS, M.B.M.C.; SILVA, V.C.L.; LEITÃO, R.S.C.; SANTOS, F.L.; PEREIRA, M.F.; LIMA, E.R.; ALMEIDA, E.L. Aspectos clínicos e histopatológicos de cadelas com neoplasia mamária submetidas à mastectomia. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.18, n.1/2, p.13-19, 2015.

SANTOS, A.A.; LOPES, C.C.; RIBEIRO, J.R.; MARTINS, L.R.; SANTOS, J.C.; AMORIM, I.F.; GÄRTNER, F.; MATOS, A.J. Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. **Veterinary Research**, v.9, n.1, 1-11, 2013. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-1>

SILVA, A.H.C.; SILVA, D.M.; RIBAS, C.R.; DITTRICH, R.L.; DORNBUSCH, P.T.; GUÉRIOS, S.D. Alterações no hemograma de cadelas com neoplasia mamária. **Ciência Animal Brasileira**, v.15, n.1, p. 87-92, 2014. <https://doi.org/10.5216/cab.v15i1.20144>

SIMPSON, E.R.; BROWN, K.A. Minireview: obesity and breast cancer: a tale of inflammation and dysregulated metabolism. **Molecular Endocrinology**, v.27, n.5, p.715-725, 2013. <https://doi.org/10.1210/me.2013-1011>

SOLANO-GALLEGO, L. Sistema reprodutivo. In: RASKIN, R.E.; MEYER, D.J. **Citologia clínica de cães e gatos – Atlas colorido e guia de interpretação**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012, p.274-281.

SORENMO, K.U.; RASOTTO, R.; ZAPULLI, V.; GOLDSCHMIDT, M.H. Development, Anatomy, Histology, Lymphatic Drainage, Clinical Features, and Cell Differentiation Markers of Canine Mammary Gland Neoplasms. **Veterinary Pathology**, v.48, n.1, p.85-97, 2011. <https://doi.org/10.1177/0300985810389480>

SORENMO, K.U.; WORLEY, D.R.; GOLDSCHMIDT, M.H. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN'S, E.G. **Small animal clinical oncology**, 5ª ed. ElsevierSaunders: St. Louis, Missouri, p.538-556, 2013.

TEIXEIRA, M.J.D.; SOBRAL, A.V.; ABREU E LIMA, M.C.; MAIA, F.C.L.; CHRISTILIS, M.; SOUZA, D.M.B.; ADRIÃO, M.; WISCHRAL, A. Avaliação da superexpressão da proteína p53 e das mutações no éxon 8 do gene TP53 em carcinomas mamários caninos e glândulas normais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.6, p.521-526, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2011000600011>

TERRA, E.M.; RODRIGUES, M.M.M.P.; MAGALHÃES, G.M.; COSTA, M.T.; AMORIM, R.L.; ROCHA, N.S. Immunohistochemical Expression of p53 and p63 in Adenomas and Carcinomas of Canine Mammary Glands. **Open Journal of Veterinary Medicine**, v.2, p.21-24, 2012. <https://doi.org/10.4236/ojvm.2012.21004>

TYLER, J. Exame clínico das glândulas mamárias. In: RADOSTITS, O.M.; MAYHEW, I.G.J.; HOUSTON, D.M. **Exame clínico e diagnóstico em veterinária**. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara koogan, 2002, p. 572-578.

TONG, J.; SUN, D.; YANG, C.; WANG, Y.; SUN, S.; LI, Q.; BAO, J.; LIU, Y. Serum starvation and thymidine double blocking achieved efficient cell cycle synchronization and altered the expression of p27, p53, bcl-2 in canine breast cancer cells. **Research in Veterinary Science**, v.105, p.10-14, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.01.008>

VEENA, P.; KUMAR, R.V.S.; RAGHAVENDER, K.B.P.; SRILATHA, Ch.; RAO, T.S.C. Immunohistochemical detection of p53 in canine mammary tumors. **Indian Journal Animal Research**, v.48, n.2, p.204-206, 2014. <https://doi.org/10.5958/j.0976-0555.48.2.043>

YAMAGAMI, T.; KOBAYASHI, T.; TAKAHASHI, K.; SUGIYAMA, M. Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification. **Journal of veterinary medicine science**, v.58, n.11, p.1079-1083, 1996. https://doi.org/10.1292/jvms.58.11_1079

YAMAMOTO, M.; HOSODA, M.; NAKANO, K.; JIA, S.; HATANAKA, K. C.; TAKAKUWA, E.; HATANAKA, Y.; MATSUNO, Y.; YAMASHITA, H. P53 accumulation is a strong predictor of recurrence in estrogen receptor-positive breast cancer patients treated with aromatase inhibitors. **Cancer Science**, v.105, p.81-88, 2014. <https://doi.org/10.1111/cas.12302>

YANG, P.; DU, C.W.; KWAN, M.; LIANG, S.X.; ZHANG, G.J. The impact of P53 in predicting clinical outcome of breast cancer patients with visceral metastasis. **Scientific reports**, v.3, p.2246, 2013. <https://doi.org/10.1038/srep02246>

ZUCCARI, D.A.P.C.; TERZIAN, A.C.B.; PEREIRA, R.S.; PAVAM, M.V.; RUIZ, C.M.; SUEIRO, F.A.R.; ANDRADE, J.C.A.; CORDEIRO, J.A. Avaliação imuno-histoquímica do gene p53 nas neoplasias mamárias caninas. **Ars veterinária**, v.21, n.3, p.344-350, 2005.

Capítulo 2 – Superexpressão de p53 está relacionada à menor tempo de sobrevivência de cadelas com neoplasia mamária

Artigo nas normas da revista Journal of Comparative Pathology (ISSN 0021-9975).

**Superexpressão de p53 está relacionada à menor tempo de sobrevida de cadelas
com neoplasia mamária**

*P53 overexpression is associated with to shorter survival time of bitches with mammary
tumor*

T. A. Moreira*, N. P. Soares*, T. R. Santos*, L. S. Santos*, L. F. Gundim*, A. A.
Medeiros-Ronchi*.

**Laboratório de Patologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, Minas
Gerais, Brasil. Correspondência: T.A. Moreira (email: thais-vet@outlook.com,
55(34)32258432). Av. Mato Grosso, 3289 - Bloco 2S - Umuarama, Uberlândia - MG,
38405-314.*

Resumo

O tumor de mama é o tipo de neoplasia mais importante em cadelas intactas. Mutações no gene supressor de tumor p53 levam à superexpressão da proteína em neoplasias mamárias e tem sido associado à pior prognóstico em mulheres, porém seu valor prognóstico em cadelas portadoras de tumores mamários é controverso. Objetivou-se avaliar a expressão de p53 em tumores mamários caninos (TMC) e verificar sua correlação com características clinicopatológicas, tumorais e sobrevida total (ST), avaliando ainda o intervalo livre de doença (ILD) e o tempo de desenvolvimento de tumor em mama remanescente (TDTMR) de cadelas submetidas à mastectomia parcial. Cem cadelas foram acompanhadas por um período mínimo de dois anos. A determinação da expressão de p53 foi realizada por meio de imunohistoquímica, utilizando a técnica de estreptoavidina-biotinaperoxidase. Foram consideradas positivas amostras com mais de 10% de células neoplásicas marcadas,

avaliadas quanto à porcentagem e intensidade de marcação. 96% (96/100) dos tumores eram malignos. Verificou-se superexpressão de p53 em 65% (65/100) dos tumores. Notou-se correlação entre superexpressão de p53 e subtipo histológico ($p=0,017$), sendo os carcinomas tubular e complexo os que mais frequentemente expressaram. Verificou-se maior escore de marcação e maior intensidade de marcação em neoplasias de alto grau histológico. Cadelas com tumores mamários que superexpressaram p53 apresentaram menor ST ($p= 0,012$), porém não houve correlação entre expressão de p53 e ILD ($p= 0,441$) e TDTMR ($p= 0,240$). A idade da cadela ao diagnóstico foi um fator que também influenciou a ST, sendo pior em cadelas com mais de oito anos ($p=0,023$). Este estudo demonstrou que a superexpressão de p53 em neoplasias mamárias de cadelas está associada a pior sobrevida e deve ser considerada como importante fator prognóstico.

Palavras-chave: P53, sobrevida, canina, tumor de mama.

Introdução

Tumores mamários caninos (TMC) representam 50 a 70% de todos os tumores que acometem fêmeas caninas intactas (GOLDSCHMIDT et al., 2017), sendo reportada taxa de malignidade de aproximadamente 50% (FOALE E DEMETRIUOU, 2011; SALAS et al., 2015).

Assim, por se constituir em importante problema de saúde nesta população, além da cadela ser considerada modelo para estudo devido às similaridades clínicas e moleculares dos TMC com as neoplasias mamárias em mulheres (QUEIROGA et al., 2011), pesquisas envolvendo a busca por marcadores moleculares que auxiliem na determinação do prognóstico dos TMC tem se intensificado nos últimos anos (TONG et

al., 2016). Dentre esses marcadores, a P53 assume importância devido seu papel na manutenção da estabilidade genômica, regulando o ciclo celular e induzindo a apoptose (YAMAMOTO et al., 2014).

O gene p53 é um dos genes supressores de tumores e a perda das suas funções inibitórias de crescimento contribui para a transformação maligna e/ou progressão tumoral (PERKINS; VANDE WOUDE, 1993). A mutação do gene p53 prejudica a habilidade da célula em detectar danos no DNA e resulta na superexpressão da proteína p53 no núcleo das células tumorais, podendo ser detectada por meio da imunohistoquímica. Já em sua forma inalterada, a p53 não se acumula nas células, pois possui uma meia-vida curta (cerca de 20 a 30 minutos), não sendo detectável por este método (HAINAUT; WIMAN, 2007).

Em mulheres com neoplasia mamária, já foi verificada correlação entre superexpressão da p53 e estadiamento TNM, envolvimento de múltiplos órgãos, maior taxa de recorrência e menor sobrevida (YANG et al., 2013; YAMAMOTO et al., 2014). Já em cadelas, poucos estudos tem avaliado o valor prognóstico da superexpressão dessa proteína, além de apresentarem resultados controversos, por vezes com estudos demonstrando relação entre superexpressão de p53 e maior agressividade tumoral (DOLKA et al., 2016) e, em outros, esta relação não sendo verificada (LEE et al., 2004; ZUCCARI et al., 2005).

As controvérsias apresentadas quanto ao valor prognóstico da p53 pode estar relacionada a fatores como: realização de avaliações com pequeno número pacientes, acompanhamento clínico por curto período de tempo, avaliação em conjunto de diferentes subtipos e estágios tumorais e uso de diferentes métodos para avaliação da p53 (BERTHEAU et al., 2013).

Assim, os objetivos deste estudo foram: avaliar a expressão de p53 nos TMC através da imunohistoquímica e verificar sua correlação com características clinicopatológicas, tumorais e sobrevida total (ST), avaliando ainda o intervalo livre de doença (ILD) e tempo de desenvolvimento de tumor em mama remanescente (TDTMR) de cadelas submetidas à mastectomia parcial.

Material e métodos

Animais e avaliação histopatológica

Foram incluídas neste estudo 100 cadelas portadoras de neoplasia mamária, encaminhadas ao Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (HV – UFU), Minas Gerais, Brasil para avaliação clínica. Este projeto foi aprovado pela CEUA (Comitê de Ética do Uso de Animais) da Universidade Federal de Uberlândia, no protocolo 127/15.

Os critérios de inclusão dos animais no estudo foram: cadelas portadoras de neoplasias mamárias, encaminhadas para mastectomia (total ou parcial, conforme avaliação cirúrgica) com exame clínico detalhado, exames de imagem (radiografia torácica e avaliação ultrassonográfica de órgãos da cavidade abdominal) para pesquisa de metástases. O critério de exclusão foi a não remoção completa de todos os nódulos tumorais mamários.

No exame físico da glândula mamária o tamanho dos tumores foi aferido com auxílio de paquímetro, sendo classificados com relação ao maior diâmetro em T1 (< 3 cm), T2 (3 a 5 cm) e T3 (> 5 cm) (Owen, 1980). As variáveis foram avaliadas por dois observadores (*TAM* e *NPS*) em conjunto.

O tratamento instituído para todas as cadelas foi cirúrgico. Após exérese dos tumores foram coletadas amostras de glândula mamária e linfonodos regionais (axilares ou inguinais, dependendo da localização tumoral). As amostras foram fixadas em formol tamponado a 10%, por 48 horas e processadas rotineiramente para confecção de lâminas histológicas coradas em hematoxilina e eosina.

Amostras dos linfonodos regionais foram avaliadas microscopicamente para detecção de metástase. O estadiamento clínico (TNM) foi realizado conforme proposto pela Organização Mundial da Saúde – OMS (Sorenmo *et al.* 2013, adaptado de Owen, 1980).

A análise histopatológica foi realizada conforme proposto por Goldschmidt *et al.* (2017) e o diagnóstico foi atribuído por dois patologistas (*TAM* e *LFG*). O grau histológico foi atribuído de acordo com o sistema Nottingham, modificado por Elston e Ellis (1991). Tendo em vista a proposta analítica de estudo, nos casos que apresentaram mais de um subtipo histológico de tumor mamário, considerou-se o mais maligno.

Análise da sobrevida

As cadelas foram clinicamente acompanhadas com periodicidade quadrimestral, até a data do óbito ou por um período mínimo de dois anos. Dados sobre o estado geral da paciente, ocorrência ou não de recidiva, surgimento de novos tumores em glândulas mamárias remanescentes ou ocorrência de metástase foram registrados. Foram necropsiadas aquelas que vieram a óbito no decorrer deste estudo e foram voluntariamente encaminhadas pelos proprietários ao Setor de Patologia Animal - UFU.

Realizou-se a avaliação do tempo de sobrevida total (ST), do intervalo livre de doença (ILD) e o tempo de desenvolvimento de tumor em mama remanescente

(TDTMR). A ST foi definida como o tempo pós-mastectomia até a data da morte ou eutanásia; o ILD foi o tempo pós-mastectomia até o desenvolvimento de recidiva ou metástase, e o TDTMR foi determinado como o tempo pós-mastectomia até o surgimento de tumor em glândula mamária remanescente.

Análise imunohistoquímica

A imunohistoquímica para avaliação da expressão de p53 foi realizada em secções dos tumores mamários com 4 µm dispostas sobre lâminas, conforme método proposto por Veena *et al.* (2014), com modificações. A recuperação antigênica por calor foi realizada em panela de pressão por 10 minutos em solução de hidroximetilaminometano (TRIS) - ácido etilenodiamino tetra-acético dissódico (EDTA), 10 mM, pH 9. Em seguida, as lâminas foram lavadas com tampão salina fosfato (Phosphate Buffered Saline – PBS 1x) e os cortes foram contornados com caneta hidrofóbica (Dako S200230).

O bloqueio da peroxidase foi realizado em solução contendo 95% de metanol e 5% de água oxigenada, durante 20 minutos. Para o bloqueio das proteínas inespecíficas utilizou-se Protein Block (Polymer Kit, Novolink), durante cinco minutos. O anticorpo anti-P53 (clone D07, Cell Marque) foi diluído 1:400 em soro albumina bovina (BSA) 1% (Amresco, 0332).

Os cortes receberam anticorpo diluído e foram incubados por 18h, à 4°C em câmara úmida. Como controle positivo da reação, utilizou-se corte histológico de seminoma canino sabidamente positivo para p53; e o controle negativo foi realizado através da omissão do anticorpo primário.

A reação foi revelada com diaminobenzina (DAB – Polymer Kit, Novolink). As lâminas foram contra coradas com Hematoxilina de Mayer (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) por 3 minutos e montadas sob lamínula.

A análise microscópica das amostras submetidas à imunohistoquímica foi feita de acordo com a frequência (média do número de células neoplásicas reativas em 10 campos, objetiva de 40x) e a intensidade de marcação para p53 (ausente, fraca, moderada e forte). A marcação para o anticorpo foi classificada como negativa quando menos de 10% das células tumorais apresentaram marcação e positiva quando a porcentagem de células marcadas foi superior a 10% (DOLKA et al., 2016).

A expressão de p53 foi avaliada conforme os escores: 0 (negativa) = de 0 à 10% de células marcadas, 1 = de 11% à 30% de células marcadas, 2 = de 31% à 50% de células marcadas, e 3 = acima de 50% de célula marcadas.

A marcação citoplasmática foi observada, porém só foi registrada como positiva quando a marcação nuclear também estava presente, como recomendado por Lee *et al.*, 2004; Dolka *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2016.

Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o programa BioEstat 5.0 (Ayres *et al.*, 2007). O teste exato de Fisher e o teste qui-quadrado foram utilizados para comparar as características clinicopatológicas e tumorais das pacientes caninas nos grupos de p53-positivas e p53-negativas. A análise multivariada por meio da correlação canônica foi utilizada para comparar os variados subtipos histológicos nos grupos positivos e negativos para p53; e ainda na comparação dos subtipos histológicos com o escore de marcação e a intensidade. Ainda, o teste qui-quadrado e o teste G foram utilizados,

conforme o caso, para comparação do grau histológico e do estadiamento TNM com escore e a intensidade de marcação.

O tempo de ST, ILD e o TDTMR foram analisados através do método de Kaplan-Meier e emprego do teste Log-Rank. Para avaliação da sobrevida foram censuradas as cadelas que ainda estavam vivas até o final do estudo e que tiveram a causa do óbito não relacionada à ocorrência de neoplasia mamária ou indeterminada; para o ILD foram censuradas as cadelas que estavam livres de recidiva ou metástase até o final do estudo e para avaliação do TDTMR foram censuradas as cadelas em que foi realizada mastectomia total ou não foi detectado surgimento de tumor em glândula mamária remanescente. A análise multivariada pela regressão de Cox foi utilizada para comparação das variáveis preditoras para a neoplasia mamária e o tempo de ST. Em todos os testes foi adotado o nível de significância de $p \leq 0,05$.

Resultados

Características das pacientes e tumores

Com relação às características clinicopatológicas, os tumores mamários foram mais frequentes em cadelas idosas (≥ 8 anos), com média de idade de $10,28 \pm 2,82$ anos e, quanto à raça, 52% (52/100) eram sem raça definida (SRD). Trinta e duas cadelas estavam em estágio IV (32/96 – 33,44%) (Tabela 1).

Quanto às características tumorais, 40% das cadelas apresentaram tumores menores que três centímetros de diâmetro (T1). Microscopicamente, os tumores malignos foram os mais frequentes (96/100 - 96%), sendo o carcinoma complexo o

subtipo histológico mais observado (29/100 - 30,20%). Da gradação histológica, observou-se predomínio de neoplasias de grau II (47/96 – 48,96%).

200

201 **Tabela 1. Frequência das características clinicopatológicas e tumorais em cadelas**
 202 **com neoplasia mamária.**

203

<i>Número de pacientes</i>	100
Idade ± DP, Mínimo/Máximo (anos)	10,28 ± 2,82 (4-17)
Adultas	34 (34%)
Idosas	66 (66%)
<i>Raça</i>	
SRD	52 (52%)
Raças	48 (48%)
Poodle	15 (31,25%)
Pinscher	8 (16,67%)
Yorkshire	5 (10,41%)
Dachshund	4 (8,33%)
Basset	4 (8,33%)
Pit Bull	3 (6,25%)
Cocker	2 (4,17%)
Pastor alemão	2 (4,17%)
Shitzu	2 (4,17%)
Outras (Lhasa, Rottweiler e Fila)	3 (6,25%)
<i>Tamanho tumoral</i>	
T1 (< 3 cm)	40 (40%)
T2 (3 a 5 cm)	27 (27%)
T3 (> 5 cm)	33 (33%)
<i>Tipo histológico</i>	
Benignos	4 (4%)
Adenoma mamário	2 (50%)
Fibroadenoma mamário	2 (50%)
Malignos	96 (96%)
Origem epitelial	
Carcinoma complexo	29 (30,20%)
Carcinoma tubular	24 (25%)
Carcinoma em tumor misto	15 (15,61%)
Carcinoma sólido	11 (11,45%)
Carcinoma papilar	7 (7,29%)
Carcinoma túbulo-papilar	3 (3,12%)
Carcinoma micropapilar invasor	1 (1,04%)
Carcinoma in situ	1 (1,04%)
Carcinoma anaplásico	1 (1,04%)
Origem mesenquimal	
Fibrossarcoma mamário	2 (3,12%)
Osteossarcoma mamário	1 (1,04%)
Origem mesenquimal e epitelial	
Carcinossarcoma	1 (1,04%)
<i>Grau histológico</i>	n= 96
I	41 (42,71%)
II	47 (48,96%)
III	8 (8,33%)
<i>TNM</i>	n=96
I	28 (29,17%)

II	15 (15,62%)
III	12 (12,5%)
IV	32 (33,34%)
V	9 (9,37%)

DP = desvio padrão

Expressão imunohistoquímica de p53

Marcação nuclear positiva foi observada em 65 amostras (65%). Raras células tiveram marcação apenas no citoplasma, sendo estas desconsideradas. O carcinoma tubular (70,83% - 17/24) e o carcinoma complexo (68,96% - 20/29) foram os subtipos histológicos que mais expressaram p53. Das quatro neoplasias benignas, uma amostra (25%) de fibroadenoma mamário foi positiva.

A análise das correlações das características clinicopatológicas e tumorais observadas nos grupos de cadelas p53-positivas e p53-negativas encontra-se na tabela 2. O subtipo histológico influenciou na expressão da p53 ($p=0,017$). Não houve correlação entre a expressão de p53 e idade, raça, tamanho tumoral, grau histológico e TNM ($p>0,05$).

Quanto ao escore de marcação observado, 35 (35%) amostras foram classificadas em escore 0 (negativas). Das positivas, 25/65 (38,46%) apresentaram escore 1, 15/65 (23,08%) eram escore 2 e 25/65 (38,46%) foram classificadas em escore 3. Da intensidade de marcação, 15/65 (23,08%) foram classificadas como intensidade fraca, 33/65 (50,77%) em moderada e em 17/65 (26,15%) casos como forte (Figura 1).

Houve correlação entre escore de marcação e grau histológico ($p=0,023$), sendo que neoplasias de grau III apresentaram maior quantidade de células marcadas (escore 3) e tumores de grau I apresentaram menor porcentagem de células marcadas (escore 1).

Quanto à intensidade de marcação da p53, a maioria dos tumores de grau I ou II demonstrou intensidade moderada ou fraca ($p=0,030$).

Não houve relação entre subtipo histológico e TNM com o escore de marcação ($p=0,221$ e $p=0,088$, respectivamente), assim como não houve associação entre subtipo histológico e TNM com intensidade de marcação ($p=0,248$ e $p=0,922$, respectivamente) (Tabela 3).

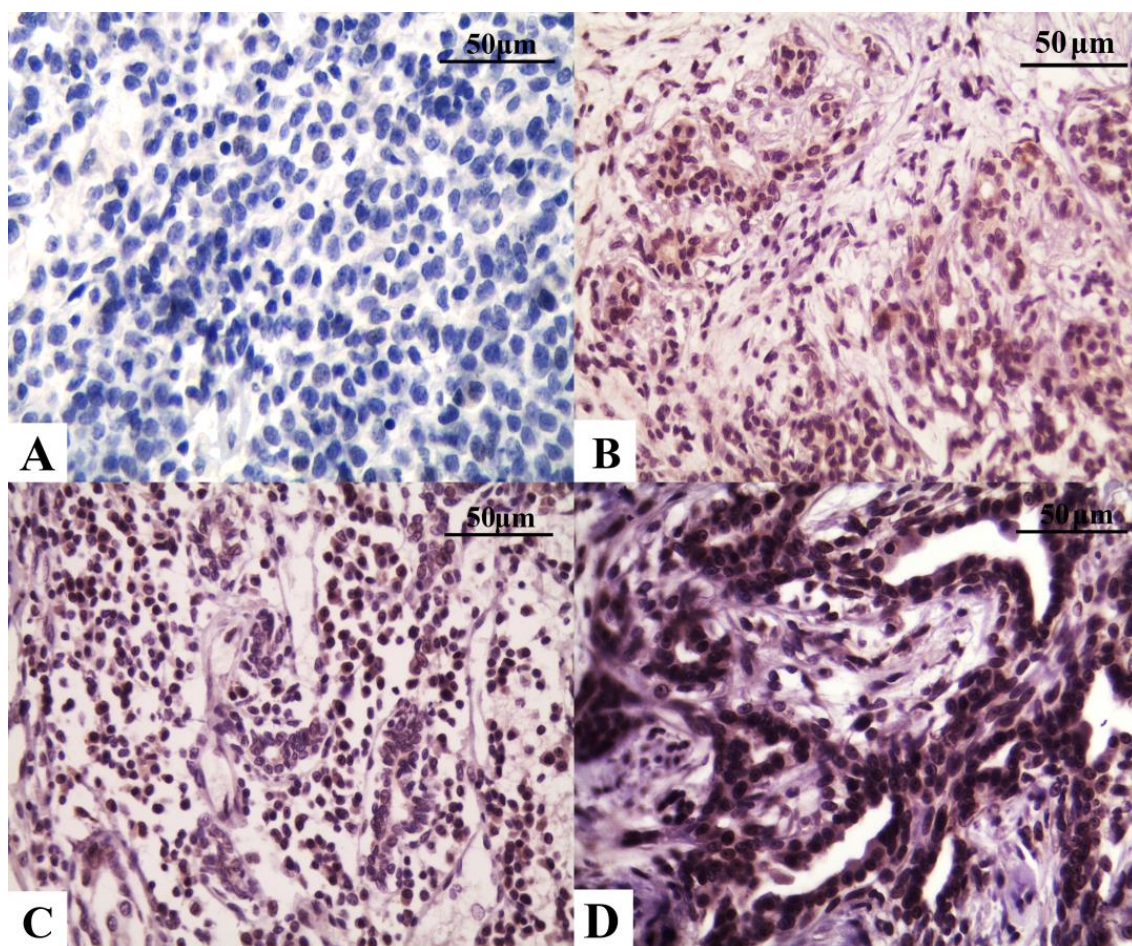


Figura 1. Escore e intensidade de marcação da p53 em neoplasias mamárias de cadelas.

A) Carcinoma sólido, escore 0 – (negativo). IHQ, 40x, 50 µm. B) Núcleos imunomarcados: Carcinoma complexo, escore 1 (positiva, 11-30% de núcleos marcados), intensidade fraca. IHQ, 40x, 50 µm. C) Carcinoma complexo, escore 2 (positiva, 31-50% de núcleos marcados), intensidade moderada. IHQ, 40x, 50 µm. D) Carcinoma complexo, escore 3 (>50% de núcleos marcados), intensidade forte. IHQ, 40x, 50 µm.

Tabela 2. Correlação entre as características clinicopatológicas e expressão de p53 em cadelas portadoras de neoplasia mamária.

<i>Características</i>	<i>P53 positivas (n=65)</i>	<i>P53 negativas (n=35)</i>	<i>p-valor</i>
Idade ao diagnóstico			0,189¹
≤ 8 anos	19 (29,23%)	15 (42,86%)	
> 8 anos	46 (70,77%)	20 (57,14%)	
Raças			0,677¹
Raça pura	30 (46,15%)	18 (51,43%)	
SRD	35 (53,85%)	17 (48,57%)	
Tamanho tumoral			0,970²
T1 (≤3 cm)	26 (40,00%)	14 (40,00%)	
T2 (> 3 e ≤ 5 cm)	18 (27,70%)	9 (25,71%)	
T3 (> 5 cm)	21 (32,30%)	12 (34,29%)	
Subtipo histológico			0,017^{3*}
Carcinoma complexo	20 (30,77%)	9 (25,71%)	
Carcinoma tubular	17 (26,15%)	7 (20%)	
Carcinoma em tumor misto	11 (16,92%)	4 (11,43%)	
Carcinoma sólido	6 (9,24%)	5 (14,28%)	
Carcinoma papilar	3 (4,61%)	4 (11,43%)	
Outros	8 (12,31%)	6 (17,15%)	
Grau histológico (n= 96)	n= 64	n= 32	0,872²
I	27 (42,19%)	14 (43,75%)	
II	31 (48,43%)	16 (50%)	
III	6 (9,38%)	2 (6,25%)	
TNM (n= 96)	n= 64	n= 32	0,829¹
I, II, III	36(56,25%)	19 (59,37%)	
IV e V	28 (43,75%)	13 (40,63%)	

*P < 0.05 é considerado significativo. ¹Teste exato de Fisher, ²Qui-quadrado. ³Análise multivariada - correlação canônica.

Tabela 3. Correlação entre grau, subtipo histológico e TNM com o escore e intensidade de marcação para p53 em neoplasias mamárias de cadelas.

<i>Grau</i>	<i>Escore (n, %)</i>			<i>p-valor</i>	<i>Intensidade (n, %)</i>			<i>p-valor</i>
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>		<i>Fraca</i>	<i>Moderada</i>	<i>Forte</i>	
I	14 (21,88%)	3 (4,68%)	10 (15,62%)	0,023 ^{1*}	9 (14,06%)	14 (21,88%)	4 (6,25%)	0,030 ^{1*}
II	8(12,5%)	12 (18,75%)	11(17,19%)		4 (6,25%)	14 (21,88%)	13 (20,31%)	
III	2 (3,13%)	0 (0%)	4 (6,25%)		2 (3,12%)	4 (6,25%)	0 (0%)	
Subtipo**								
CC	7 (10,78%)	4 (6,15%)	9 (13,88%)	0,221 ²	5 (7,71%)	7 (10,78%)	8 (12,32%)	0,248 ²
CT	4 (6,15%)	4 (6,15%)	9 (13,88%)		5 (7,71%)	11 (16,93%)	1 (1,53%)	
CTM	4 (6,15%)	5 (7,70%)	2 (3,07%)		2 (3,07%)	6 (9,23%)	3 (4,61%)	
CS	3 (4,61%)	1 (1,53%)	2 (3,07%)		2 (3,07%)	2 (3,07%)	2 (3,07%)	
CP	1 (1,53%)	1 (1,53%)	1 (1,53%)	0,088 ³	0 (0%)	3 (4,61%)	0 (0%)	0,922 ³
Outros	4 (6,15%)	2 (3,07%)	2 (3,07%)		1 (1,53%)	4 (6,15%)	3 (4,61%)	
TNM								
I,II,III	17 (26,57%)	9 (14,06%)	10 (15,62%)		9 (14,06%)	18 (28,13)	9 (14,06%)	
IV, IV	7 (10,94%)	6 (9,37%)	15 (23,44%)		6 (9,37%)	14 (21,88%)	8 (12,5%)	

*P < 0.05 é considerado significativo. **CC= carcinoma complexo, CT= carcinoma tubular, CTM= Carcinoma em tumor misto, CS= Carcinoma sólido, CP= carcinoma papilar. ¹Teste G (Willians), ²Análise multivariada – correlação canônica, ³Teste qui-quadrado.

Sobrevida total, intervalo livre de doença e tempo de desenvolvimento de tumor em mama remanescente

Ao final deste estudo, 59 cadelas haviam morrido e 41 estavam vivas. Das 59 cadelas que vieram a óbito, 27 foram encaminhadas para necropsia, sendo a causa da morte relacionada à metástase de neoplasia mamária em 21 casos. Dos demais casos (32 cadelas), exames de imagem (radiografia e ultrassonografia) e biópsias realizadas durante o acompanhamento clínico permitiram relacionar a causa da morte à neoplasia mamária em 16 casos. Assim, ao todo, em 37 de 59 casos (62,72%) o óbito teve relação com a neoplasia mamária, não sendo verificada esta relação em 22 casos (14 mortes por outras causas e oito indeterminadas) sendo estas cadelas censuradas no cálculo da sobrevida total. A média de sobrevida total (ST) foi de $16,6 \pm 10,5$ meses ($500 \pm 316,15$ dias).

Houve uma maior taxa de óbito no grupo de cadelas com tumores que superexpressaram p53 (43/65 - 66,16%), comparado ao grupo das cadelas negativas (16/35 - 45,71%), sendo observada correlação entre a sobrevida e superexpressão de p53 ($p=0,012$) (Figura 2 – A).

Com relação à sobrevida, 38,98% (23/59) das cadelas com tumores que superexpressaram p53 tiveram sobrevida < 12 meses e 33,90% (20/59) tiveram sobrevida > 12 meses. Já dentre as cadelas que foram negativas para p53, 3,39% (2/59) tiveram sobrevida < 12 meses e 23,73% (14/59) tiveram sobrevida > 12 meses. Assim, cadelas com tumores que superexpressaram p53 tiveram pior sobrevida, sendo verificada correlação com a superexpressão de p53 ($p=0,012$, $X^2=8,02$).

A mastectomia total foi realizada em 32% (32/100) das pacientes deste estudo e em 68% (68/100) foi feita mastectomia parcial. Das cadelas submetidas à mastectomia

parcial 27,94% (19/68) tiveram desenvolvimento de tumor em glândula mamária remanescente. Notou-se recidiva local em 4% das pacientes (4/100), sendo que uma havia realizado mastectomia total (3,12%; 1/32) e três parcial (4,41%; 3/68). Nas cadelas que tiveram recidiva local, também ocorreu desenvolvimento posterior de metástase.

Quanto às cadelas que tiveram recidiva local ou metástase (37/100), observou-se uma maior ocorrência no grupo de cadelas com tumores que superexpressaram p53 (29/65 – 44,61%) comparado ao grupo das cadelas negativas (8/35 – 22,88%); e também uma maior ocorrência de desenvolvimento de novo tumor em mama remanescente no grupo com superexpressão de p53 (15/65 – 23,07%) comparado ao negativo (4/35 – 6,15%).

O ILD foi em média $9,3 \pm 8,3$ meses (280,75 \pm 251,44 dias), sendo de 10,27 \pm 8,29 meses no grupo de cadelas com tumores que superexpressaram p53 e de 7,62 \pm 8,56 meses no grupo de cadelas negativas. O TDMR foi em média de 7,9 \pm 7,4 meses (239,21 \pm 223,27 dias), sendo 7,86 \pm 6,80 meses no grupo com tumores que superexpressaram p53 e 8,25 \pm 10,71 meses no grupo negativo. Não obstante, a análise de ambas estas variáveis (ILD e TDMR) não apresentou correlação com a expressão de p53 (Figura 2 – B, C respectivamente).

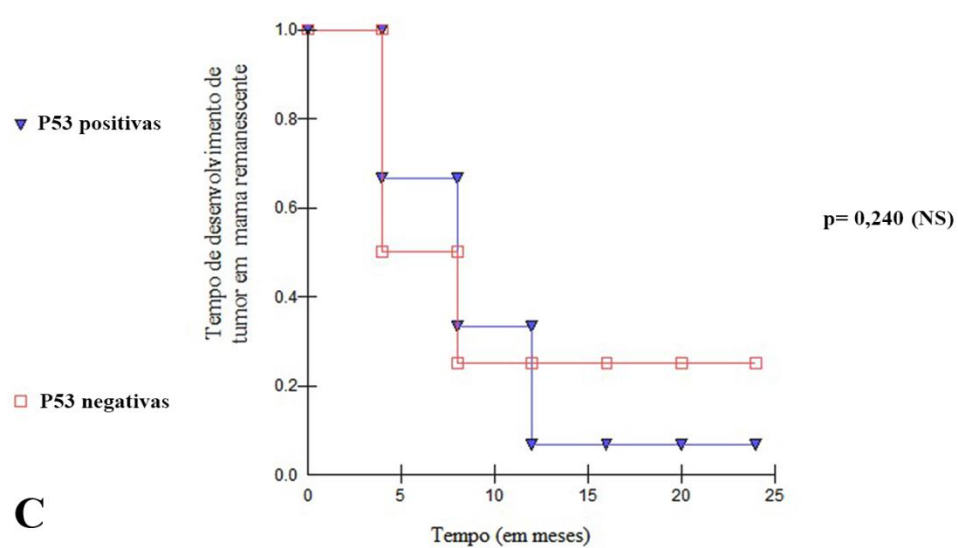
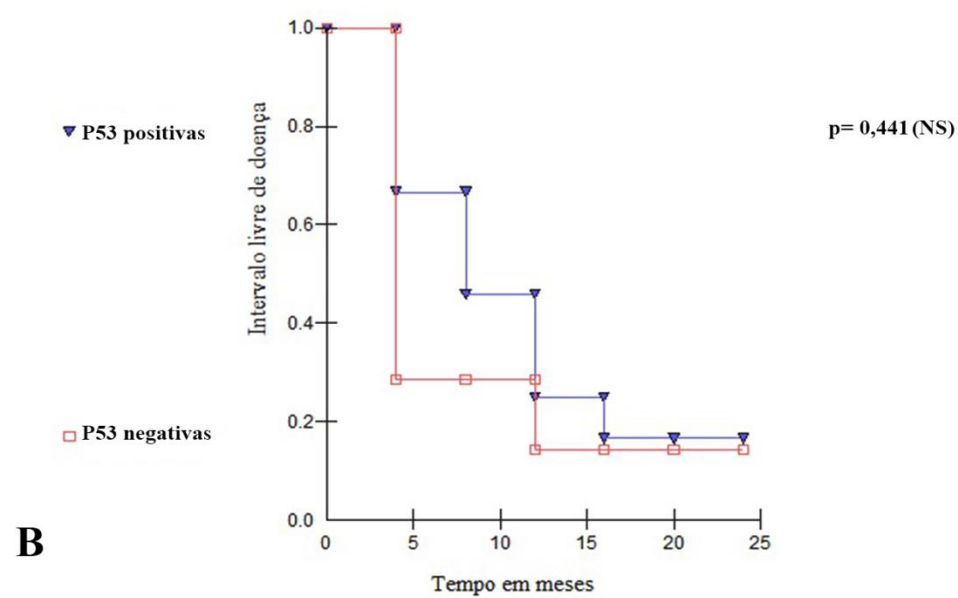
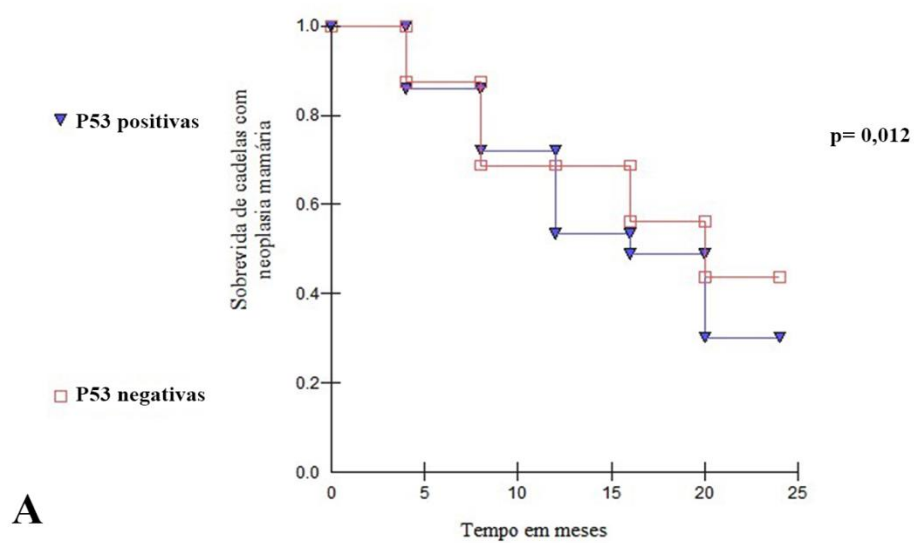


Figura 2. Curvas de sobrevida Kaplan-Meier para a expressão da proteína p53 em amostras de neoplasias mamárias de cadelas, em relação a: A) Sobrevida total ($p=0,012$); B) Intervalo livre de doença ($p=0,441$); C) Tempo de surgimento de tumor em mama remanescente ($p=0,240$). NS= Não significativo.

À análise multivariada entre a ST e as variáveis preditoras para a neoplasia mamária, observou-se correlação com a idade da cadela ao diagnóstico ($p=0,02$), sendo confirmada a correlação entre a sobrevida e expressão de p53 ($p=0,01$). Não houve correlação entre as demais variáveis analisadas (Tabela 4).

Tabela 4. Análise multivariada de regressão de Cox da sobrevida total de cadelas com neoplasia mamária em comparação às variáveis preditoras.

Variáveis	Erro Padrão	p-valor	Taxa de risco	IC (95%)
Idade	0,058	0,023*	0,876	0,782 – 0,982
Raça	0,053	0,941	1,003	0,904 – 1,114
Tamanho do tumor	0,231	0,646	0,899	0,571 – 1,415
TNM	0,126	0,412	1,109	0,865 – 1,422
Subtipo histológico	0,053	0,275	0,943	0,849 – 1,047
Grau histológico	0,231	0,470	0,846	0,537 – 1,332
Expressão de p53	0,398	0,012*	2,719	1,244 - 5,939

* $P < 0.05$ é considerado significante.

Discussão

A maior ocorrência de neoplasias mamárias malignas, com maior frequência em cadelas idosas foi retratada nesse estudo, assim como observado por Dolka *et al.* (2016) e Rasotto *et al.* (2017). Ademais, em análise multivariada das variáveis preditoras para a sobrevida de cadelas com tumor de mama, a idade foi um fator significativo, com cadelas idosas apresentando pior sobrevida, como também constatado por Dias *et al.* (2016) e Dolka *et al.* (2016).

Poucos estudos com TMC têm correlacionado subtipo histológico à sobrevida. Até o momento, Santos *et al.* (2013) e Rasotto *et al.* (2017) sugerem uma associação

dos subtipos carcinoma complexo e tubular a uma maior sobrevida e menor risco de morte pela doença. Entretanto, no presente estudo não foi observada correlação entre o subtipo histológico e sobrevida. Nesse sentido, estudos adicionais são necessários para verificar esta questão.

Superexpressão de p53 foi relatada em cerca de 30% de mulheres (Dumai *et al.*, 2013) e cadelas portadoras de tumores mamários (Lee *et al.*, 2004; Veena *et al.*, 2014; Dolka *et al.*, 2016). Os resultados aqui apresentados demonstraram alta expressão de p53 nos tumores mamários (65%), sendo esta frequência influenciada pelo subtipo tumoral. A maior frequência de superexpressão de p53 pode estar relacionada ao predomínio neste estudo dos subtipos histológicos carcinoma complexo e carcinoma tubular, uma vez que o tipo histológico influencia na imunoexpressão de p53, além de Pedraza-Ordoñez *et al.* (2015) e Kim *et al.* (2016) também relatarem maior taxa de expressão desses subtipos.

Escore e intensidade de marcação foram fatores independentes do subtipo histológico, semelhante ao observado por Teixeira *et al.* (2011). Já o grau histológico, geralmente utilizado como indicador prognóstico tumoral (Kim *et al.*, 2016; Rasotto *et al.*, 2017) demonstrou-se relacionado à intensidade e escore de marcação da p53. Tumores de alto grau apresentaram maior escore de marcação e maior intensidade de coloração, assim como observado por Golmohammadi e Pejhan (2012), sendo a alta expressão da p53 associada a neoplasias mamárias de alto grau e mais agressivas.

Superexpressão de p53 foi observada em 25% das neoplasias mamárias benignas. Outros estudos já demonstraram superexpressão em tumores mamários benignos (11%: Muto *et al.*, 2000), sendo relatada em até 100% (Zuccari *et al.*, 2005; Terra *et al.*, 2012). É importante ressaltar que mutações no gene p53 podem ser o primeiro evento na carcinogênese dos TMC (Muto *et al.*, 2000), já tendo sido inclusive

detectadas em glândulas mamárias contralaterais ao tumor em cadelas (Teixeira *et al.*, 2011).

Apesar de tamanho tumoral ser considerado fator prognóstico para os TMC, sendo reportada uma pior sobrevida para cadelas com tumores maiores que três centímetros (Cassali *et al.*, 2013; Rasotto *et al.*, 2017), os estudos que assim como este realizaram a análise do tamanho tumoral nos TMC não observaram correlação com a superexpressão de p53 (Bertagnolli *et al.*, 2009; Dolka *et al.*, 2016).

Em mulheres, nota-se uma associação entre a expressão de p53 e um estágio TNM avançado (Yang *et al.*, 2013). Não obstante, neste estudo o estadiamento (TNM) não foi correlacionado à expressão de p53, escore, intensidade ou à sobrevida das cadelas, de forma semelhante ao observado por Dolka *et al.* (2016).

Em Medicina Veterinária, poucos trabalhos têm avaliado a superexpressão de p53 em TMC com relação à sobrevida. Lee *et al.* (2004) verificaram correlação entre a superexpressão de p53 e pior sobrevida, de forma semelhante ao observado neste estudo. Já Zuccari *et al.* (2005) não verificaram correlação entre superexpressão de p53 e sobrevida ou ILD. Dolka *et al.* (2016) apesar de correlacionarem a superexpressão de p53 à ocorrência de tumores pouco diferenciados, com alto índice mitótico, invasivos e com presença de necrose, também não constataram correlação quanto ao tempo de sobrevida total. As controvérsias apresentadas quanto ao valor prognóstico da p53 pode estar relacionada a fatores como: realização de avaliações com pequeno número de pacientes, acompanhamento clínico por curto período de tempo, avaliação em conjunto de diferentes subtipos e estágios tumorais e uso de diferentes métodos para avaliação da p53 (Bertheau *et al.*, 2013).

A superexpressão de p53 nos TMC se mostrou fortemente correlacionada à sobrevida, sendo que cadelas com tumores que superexpressaram p53 tiveram menor

sobrevida, assim como relatado em mulheres Said *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013; Yamamoto *et al.*, 2014). Entretanto, diferente dos tumores mamários em mulheres (Yang *et al.*, 2013; Yamamoto *et al.*, 2014) os TMC não demonstraram correlação entre superexpressão de p53 e ILD.

A imunohistoquímica é um método eficiente para detecção de mutações do gene p53, já tendo sido estabelecida correlação entre superexpressão dessa proteína e ocorrência de mutações no gene p53 (Lee *et al.*, 2004), levando ao seu acúmulo no núcleo das células tumorais (Maki, 2010; Tong *et al.*, 2016). Assim, na avaliação da superexpressão, recomenda-se que seja considerada como positiva a expressão nuclear da proteína, sendo considerada a marcação citoplasmática apenas quando a nuclear também estiver presente na mesma célula (Lee *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2013; Dolka *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2016). Entretanto, alguns estudos consideram como verdadeira a marcação exclusivamente citoplasmática da p53, justificando sua ocorrência pelo sequestro da proteína alterada para esse compartimento celular (Behrens *et al.*, 2001; Teixeira *et al.*, 2011) o que pode contribuir para resultados controversos entre autores.

Horta *et al.* (2014) em avaliação da técnica cirúrgica em cadelas com tumor de mama, verificaram novo tumor em glândula mamária remanescente em 23,08% (33/143) das cadelas avaliadas, estando este valor próximo ao verificado nesse estudo (27,94%). Quanto ao TDTMR, este não apresentou correlação com a superexpressão de p53, possivelmente devido ao pequeno número de cadelas que desenvolveram tumor em mama remanescente (19/100). Até o momento, não foram publicados estudos relacionando TDTMR e superexpressão de p53 em cadelas com tumores mamários.

Conclusão

Este estudo demonstrou que a superexpressão de p53 em neoplasias mamárias de cadelas está relacionada à pior sobrevida, embora não apresente relação com o intervalo livre de doença e tempo de surgimento de tumor em mama remanescente. Esta superexpressão ocorre com alta frequência e pode ser influenciada pelo tipo histológico, sendo mais observada nos carcinomas tubular e complexo. Demonstrou-se ainda que a idade da cadela ao diagnóstico também é importante fator prognóstico, determinando menor sobrevida em cadelas idosas. Dessa forma, sugere-se que a análise da p53 deve ser considerada como um método complementar para adequada determinação do prognóstico e tratamento dos TMC.

Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte técnico fornecido pelo Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (HV- UFU) para acompanhamento clínico dos casos. A pesquisa foi financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), por meio dos editais 01/2014 – Demanda Universal (projeto APQ-01816-14) e 02/2016 – Programa Pesquisador Mineiro (PPM-00758-16) e parcialmente pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por meio de bolsa de estudos.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflitos de interesse com respeito à pesquisa, autoria e/ou publicação deste artigo.

REFERÊNCIAS

- Ayres M, Ayres Júnior M, Ayres DL, Santos AAS (2007) BioEstat: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. *Versão 5.0*.
- Behrens P, Brinkmann U, Fogt F, Wernert N, Wellmann A (2001) Implication of the proliferation and apoptosis associated CSE1L/CAS gene for breast cancer development. *Anticancer Research*, **21**: 2413- 2417.
- Bertagnolli AC, Cassali GD, Genelhu MCLS, Costa FA, Oliveira JFC, Gonçalves PBD (2009) Immunohistochemical expression of p63 and DNp63 in mixed tumors of canine mammary glands and its relation with p53 expression. *Veterinary Pathology*, **46**, 407–415.
- Bertheau P, Lehmann-Che J, Varna M, Dumay A, Poirot B *et al.* (2013) P53 in breast cancer subtypes and new insights into response to chemotherapy. *The Breast*, **22**, 27-29.
- Burke HB, Hutter RVP, Henson DE (2012) Breast carcinoma. In: *Prognostic factors in cancer*, 3th Edit., P. Hermanek, Gospodarowicz MK, Henson DE, Hutter RVP, Sobin L, Eds., Springer Science & Business Media, New Delhi, pp. 57-62.
- Cassali GD, Lavallo GE, Ferreira E, Estrela-Lima A, Nardi AB *et al.* (2013) Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, **7**, 38-69.
- Dias MLM, Andrade JML, Castro MB, Galera PD (2016) Survival analysis of female dogs with mammary tumors after mastectomy: epidemiological, clinical and morphological aspects. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **36**, 181-186.
- Dolka I, Król M, Sapierzyński R. Evaluation of apoptosis-associated protein (Bcl-2, Bax, cleaved caspase-3 and p53) expression in canine mammary tumors: An immunohistochemical and prognostic study (2016) *Research and Veterinary Science*, **105**, 124-33.
- Elston CW, Ellis IO (1991) Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, **19**, 403-410.
- Goldschmidt MH, Peña L, Zappulli V (2017) Tumors of the mammary gland. In: *Tumors in domestic animals*, 5th Edit., DJ Meuten, Ed., Wiley-Blackwell, New Jersey, pp. 723-765.
- Golmohammadi R, Pejhan A (2012) The prognostic value of the P53 protein and the Ki67 marker in breast cancer patients. *Journal of Pakistan Medical Association*, **62**, 871-875.
- Horta RS, Lavallo GE, Cunha RMC, Moura LL, Araújo RB *et al.* (2014) Influence of surgical technique on overall survival, disease free interval and new lesion development interval in dogs with mammary tumors. *Advances in Breast Cancer Research*, **3**, 38-46.
- Maki CG (2010) P53 localization. In: *P53, Molecular biology intelligence unit A* AYED, HUPP T. Springer science & Business Media, New York, pp.117-124.

- Muto T, Wakui S, Takahashi H, Maekawa S, Masaoka T *et al.* (2000) P53 gene mutations occurring in spontaneous benign and malignant mammary tumors of the dog. *Veterinary Pathology*, **37**, 248–253.
- Owen LN (1980). TNM classification of tumors in domestic animals. *World Health Organization*, **149**, Geneva, Switzerland edition.
- Perkins AS, Vande Woude GF (1993). Principles of molecular cell biology of cancer: oncogenes. In: *Cancer: principles and practice of oncology*. DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. JB Lippincott Co, Philadelphia, pp.35-56.
- Said R, Hong DS, Warneke CL, Lee JJ, Wheler JJ *et al.* (2013) P53 Mutations in advanced cancers: clinical characteristics, outcomes, and correlation between progression-free survival and bevacizumab-containing therapy. *Oncotarget*, **4**, 705-714.
- Sorenmo KU, Worley DR, Goldschmidt MH (2013) Tumors of the mammary gland. In: *Small animal clinical oncology*, 5th Edit., SJ Withrow, MacEwen's EG, Eds., Elsevier Saunders: St. Louis, Missouri, pp. 538-556.
- Kim HW, Jang YG, Shin JI, Seung BJ, Ju JH *et al.* (2016) Evaluation of tumor prognostic markers in malignant canine mammary carcinoma. *Pakistan Veterinary Journal*, **36**, 332-337.
- Lee CH, Kim WH, Lim JH, Kang MS, Kim DY *et al.* (2004) Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. *Journal of Veterinary Science*, **5**, 63–69.
- Pedraza-Ordoñez F, Montoya-Florez LM, Bulla C, Rocha NS (2015) Analisis of immunohistochemical prognostic markers in canine mammary cancer and its relation to postsurgical survival. *Open Journal of Pathology*, **5**, 90-99.
- Rasotto R, Berlatto D, Goldschmidt MH, Zappulli V (2017) Prognostic significance of canine mammary tumor histologic subtypes: an observational cohort study of 229 cases. *Veterinary Pathology*, **54**, 571-578.
- Teixeira MJD, Sobral AV, Abreu e Lima MC, Maia FCL, Christilis M *et al.* (2011) Avaliação da superexpressão da proteína p53 e das mutações no éxon 8 do gene TP53 em carcinomas mamários caninos e glândulas normais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **31**, 521-526.
- Terra EM, Rodrigues MMMP, Magalhães GM, Costa MT, Amorim RL *et al.* (2012) Immunohistochemical expression of p53 and p63 in adenomas and carcinomas of canine mammary glands. *Open Journal of Veterinary Medicine*, **2**, 21-24.
- Tong J, Sun D, Yang C, Wang Y, Sun S *et al.* (2016) Serum starvation and thymidine double blocking achieved efficient cell cycle synchronization and altered the expression of p27, p53, bcl-2 in canine breast cancer cells. *Research in Veterinary Science*, **105**, 10-14.

- 516 Veena P, Kumar RVS, Raghavender KBP, Srilatha CH, Rao TSC (2014)
517 Immunohistochemical detection of p53 in canine mammary tumors. *Indian Journal of*
518 *Animal Research*, **48**, 204-206.
- 519 Yamamoto M, Hosoda M, Nakano K, Jia S, Hatanaka KC *et al.* (2014) P53
520 accumulation is a strong predictor of recurrence in estrogen receptor-positive breast
521 cancer patients treated with aromatase inhibitors. *Cancer Science*, **105**, 81–88.
- 522 Yang P, Du CW, Kwan M, Liang SX, Zhang GJ (2013) The impact of P53 in predicting
523 clinical outcome of breast cancer patients with visceral metastasis. *Scientific reports*, **3**,
524 1-6.
- 525 Zuccari DAPC, Terzian ACB, Pereira RS, Pavam MV, Ruiz CM *et al.* (2005) Avaliação
526 imuno-histoquímica do gene p53 nas neoplasias mamárias caninas. *Ars veterinaria*, **21**,
527 344-350.