

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**VIDA E MORTE NOS CARCINOMAS MAMÁRIOS CANINOS: ESTUDO
IMUNOHISTOQUÍMICO DA ATIVIDADE PROLIFERATIVA E APOPTOSE**

Ariana Sousa Martins

Orientador(es)

Prof. Doutora Patrícia Carla Araújo de Faria Dias Pereira

Co-Orientador(es)

Prof. Doutor Augusto Manuel Rodrigues Faustino

Porto 2014

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**VIDA E MORTE NOS CARCINOMAS MAMÁRIOS CANINOS: ESTUDO
IMUNOHISTOQUÍMICO DA ATIVIDADE PROLIFERATIVA E APOPTOSE**

Ariana Sousa Martins

Orientador(es)

Prof. Doutora Patrícia Carla Araújo de Faria Dias Pereira

Co-Orientador(es)

Prof. Doutor Augusto Manuel Rodrigues Faustino

Porto 2014

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Patrícia Dias Pereira, minha orientadora, professora e grande exemplo de profissional, por todas as oportunidades de aprendizagem que me proporcionou, por me apoiar e orientar nesta etapa. Quero também expressar a minha imensa gratidão por todas as sugestões científicas, pelos comentários pertinentes e discussão crítica dos resultados e acompanhamento e incentivo constantes.

Ao Professor Doutor Augusto Faustino pela atenção, disponibilidade e auxílio ao longo destes meses, pelas críticas ao trabalho, pela preocupação e pela simpatia. Obrigada também por me ter dado a oportunidade de passar uma temporada em Milão, de ter aprendido com os seus colegas e por ter vivido uma das melhores fases da minha vida.

À Professora Doutora Fátima Gärtner por ter autorizado a minha circulação pelo Laboratório de Patologia Veterinária e também pela cedência de material bibliográfico para a realização do meu trabalho.

À Doutora Ana Canadas pela ajuda e apoio constantes, por estar sempre disponível para responder às minhas dúvidas e pela dedicação.

Ao Professor Doutor Júlio Carvalheira pela disponibilidade em me ajudar na análise estatística dos resultados deste trabalho e pelo tempo concedido para o esclarecimento das minhas questões.

Às técnicas do Laboratório de Patologia Veterinária, Alexandra Rêma e Soraia Gonçalves, pela forma paciente e dedicada com que me ensinaram a técnica de imunohistoquímica. Obrigada pela ajuda dada ao longo deste estágio.

À D. Luísa Mariano pela simpatia, amizade e ajuda que me deu sempre que pôde.

À minha companheira de estágio, Leonor, pela amizade, pela ajuda prestada, pelos tempos de descontração e de conversa animada.

A todos os meus grandes amigos que partilharam comigo estes anos na veterinária, por tornarem tudo mais divertido. Tenho a certeza que muitos vão ficar para a vida inteira.

Ao Hugo pela motivação e incentivo, por tornar as coisas complicadas em coisas simples, pela paciência para aturar a minha má disposição e por muito mais que só ele sabe. Mesmo distante, não deixou de ser o meu maior apoio.

A toda a minha família, em especial aos meus pais por terem acreditado sempre em mim, me terem proporcionado a oportunidade de estudar veterinária e por serem as pessoas mais importantes desde sempre. Obrigada ao meu pai que é um grande pai e que está sempre lá quando eu preciso e por nunca ter permitido que me faltasse nada. À minha mãe pelo apoio que me dá, pela amizade, por ser um pilar na minha vida e um grande exemplo para mim.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIF – Apoptosis inducing factor
APES - 3-aminopropyltriethoxysilane em acetona
ATP – Adenosina trifosfato
BSA - Bovine serum albumin
CA - Carcinoma anaplásico
CS – Carcinoma sólido
CTP - Carcinoma tubulopapilar
DAB - Cromogéneo 3,3-diaminobenzidina
DP - Desvio padrão
HE - Hematoxilina-eosina
HER-2 - Human Epidermal growth factor Receptor 2
HPF – High Power Field
ICBAS - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar
IHQ - Estudo/análise imunohistoquímico/a
MIMV - Mestrado Integrado em Medicina Veterinária
OMS - Organização Mundial de Saúde
OVH – Ovariohisterectomia
SAS - Statistical Analysis System
T - Temperatura
TBS - Tris buffered saline
TMC – Tumores mamários caninos

RESUMO

A proliferação e a morte celular são aspetos chave na dinâmica da transformação neoplásica. A utilização de marcadores de proliferação celular surge como um método bastante objetivo e de elevada especificidade na avaliação da atividade mitótica em neoplasias e a identificação de células em processo apoptótico mostra-se de elevada importância pois durante o crescimento tumoral existe um equilíbrio entre a proliferação e a morte celular, no qual, o processo de apoptose se encontra envolvido.

O objetivo deste projeto consistiu na avaliação imunohistoquímica da atividade proliferativa e apoptose em carcinomas mamários caninos e no estudo da correlação entre ambos os eventos. Foi também estudada a associação entre os seus níveis de expressão com o tipo e grau histológico das lesões, assim como com os critérios histológicos utilizados pelo método de Nottingham para a gradação histológica dos carcinomas mamários.

Este trabalho revelou um aumento gradual nos valores médios de positividade para o Ki-67, partindo do tecido mamário normal e culminando nos carcinomas malignos de grau III. A Caspase-3 apresentou elevada imunoexpressão nas amostras de mama normal e, nos carcinomas, foi aumentando a sua expressão à medida que estes se tornavam mais indiferenciados. Para além disso, nos carcinomas foi possível observar que a marcação com o Ki-67 e com a Caspase-3 estava associada de forma estatisticamente significativa com o grau histológico, pleomorfismo nuclear e índice mitótico mas não com o tipo histológico e com a formação tubular. Foi possível constatar que tumores com maior atividade proliferativa apresentam, também, um maior número de células em apoptose.

Outro dos objetivos propostos para este período de estágio consistiu na aquisição de competências práticas no domínio da patologia veterinária e na realização do diagnóstico histopatológico, mediante o acompanhamento da rotina do Laboratório de Patologia Veterinária do ICBAS.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	III
LISTA DE ABREVIATURAS	IV
RESUMO	V
INTRODUÇÃO/REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
NEOPLASIAS MAMÁRIAS EM CADELAS	1
PROLIFERAÇÃO CELULAR E KI-67	2
APOPTOSE E CASPASE-3	4
MATERIAL E MÉTODOS	6
RESULTADOS	9
CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	9
GRAU HISTOLÓGICO	10
IMUNOEXPRESSÃO DO KI-67 E DA CASPASE-3 EM TECIDO MAMÁRIO CANINO	10
IMUNOEXPRESSÃO DO KI-67	10
Tecido mamário normal	10
Neoplasias malignas	11
IMUNOEXPRESSÃO DA CASPASE-3	13
Tecido mamário normal	13
Neoplasias malignas	14
DISCUSSÃO	15
PERSPETIVAS FUTURAS	22
ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO DECORRER DO ESTÁGIO CURRICULAR	23
BIBLIOGRAFIA	24

INTRODUÇÃO/REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

NEOPLASIAS MAMÁRIAS EM CADELAS

Os tumores mamários são a neoplasia mais frequente em cadelas (Engingler *et al.* 2013; Beck *et al.* 2013; Pawlowski *et al.* 2013) e representam, aproximadamente, 50% de todas as neoplasias nesta população animal (Sorenmo 1998). A maioria das neoplasias da glândula mamária das cadelas são de origem epitelial e cerca de metade são malignas (Bostock 1986). A maioria afeta cadelas com idade entre os 8 e os 10 anos (Queiroga & Lopes 2002), sendo rara a sua ocorrência em cadelas com idade inferior a 4 anos (Lana *et al.* 2007). Os tumores mamários caninos (TMC) apresentam características similares aos tumores de mama da mulher (Matos *et al.* 2012; Pinho *et al.* 2012) mas a taxa de incidência entre cadelas apresenta-se três vezes superior (Egenvall *et al.* 2005; Pawlowski *et al.* 2013).

A ocorrência destas neoplasias é reduzida através da prática de ovariectomia (OVH) em cadelas jovens, especialmente se realizada antes da maturidade sexual ser atingida (Jones *et al.* 1997; Sorenmo *et al.* 2000). No entanto, este efeito protetor que a OVH exerce sobre o desenvolvimento dos TMC desaparece ou torna-se mais atenuado quando a cirurgia é realizada em cadelas com mais de dois anos e meio de idade (Rutteman & Kirpensteijn 2003; Sorenmo *et al.* 2000). A OVH em idades mais tardias parece não afetar o desenvolvimento de tumores mamários malignos, no entanto, parece haver uma redução no número de tumores benignos (Lana *et al.* 2007; Misdorp 2002; Rutteman & Kirpensteijn 2003).

A invasão tumoral e metastização são as principais causas de mortalidade em mulheres com cancro de mama (Walker *et al.* 1997) e em cadelas com tumores mamários malignos (Lana *et al.* 2007; Santos *et al.* 2011). A formação de metástases pode observar-se a nível regional (nos gânglios linfáticos regionais) ou pode ocorrer disseminação sistémica, ocorrendo por via linfática ou sanguínea.

Do ponto de vista clínico, os TMC podem ter uma apresentação muito variável. Os TMC podem ser únicos ou múltiplos, envolvendo uma ou mais glândulas mamárias em simultâneo. Estas neoplasias podem surgir como pequenos nódulos não infiltrativos ou como nódulos de elevadas dimensões por vezes ulcerados, com aderências aos planos mais profundos e com sinais de metastização ganglionar e/ou metastização à distância. (Pérez-Alenza *et al.* 2000; Hellmén *et al.* 1993). Esta variabilidade na apresentação clínica é acompanhada por semelhante variedade a nível histológico. Existem vários sistemas de

classificação de neoplasias mamárias propostos por diferentes autores, cada um com as suas fundamentações. Clinicamente, a importância do sistema de classificação histológica reside na sua capacidade de prever o comportamento biológico de determinado tumor (Sarli *et al.* 2002). Atualmente, o sistema de classificação histológica consensualmente mais utilizado é o proposto pela OMS. Este sistema organiza os tumores em quatro grandes grupos: tumores malignos, tumores benignos, tumores não classificados e hiperplasias/displasias mamárias. Os tumores malignos dividem-se em carcinomas não infiltrativos (*in situ*), carcinomas complexos, carcinomas simples, carcinomas de tipo especial, sarcomas, carcinossarcomas e carcinomas ou sarcomas em tumores benignos (Misdorp *et al.* 1999). Os carcinomas (tumores de origem epitelial) apresentam-se como os tumores malignos mais comuns em cadelas. Dentro dos carcinomas, os carcinomas simples, constituídos por apenas um tipo celular, são aqueles que registam maior frequência, (Misdorp *et al.* 1999; Lana *et al.* 2007) podendo ser divididos em três tipos: tubulopapilares, sólidos e anaplásicos (Misdorp *et al.* 1999). Estes tumores têm tendência a infiltrar os tecidos e vasos circundantes (Misdorp 2002). Os carcinomas complexos distinguem-se dos simples por envolverem a componente epitelial luminal mas também a mioepitelial (Misdorp *et al.* 1999). Os carcinomas de tipo especial são pouco frequentes. Os sarcomas mamários representam também uma baixa proporção de casos (10 a 15 %) e estão descritos como sendo os tipos histológicos de pior prognóstico (Else & Hannant 1979; Hellmén *et al.* 1993; Sorenmo 2003). Os carcinossarcomas são neoplasias extremamente raras constituídas por componente epitelial (carcinomatosa) e por tecido mesenquimatosa (sarcomatosa) (Lana *et al.* 2007).

PROLIFERAÇÃO CELULAR E KI-67

Durante a carcinogénese é possível reconhecer determinadas características essenciais para que ocorra transformação celular, todas elas interligadas e que devem ser entendidas de forma integrada: aquisição de sinalização proliferativa autónoma, resistência à apoptose, inibição dos supressores de crescimento, potencial replicativo ilimitado, capacidade de invasão e metastização e de angiogénese (Hanahan *et al.* 2000). Os tecidos normais têm a capacidade de controlar meticulosamente a produção e libertação de sinais promotores de crescimento que possam induzir a progressão no ciclo celular, assegurando assim o controlo do número de células e portanto a manutenção da arquitetura e função habitual. Os mecanismos de controlo da proliferação celular são profundamente alterados no decorrer do processo de transformação neoplásica,

verificando-se que as células tumorais adquirem capacidade de manter uma proliferação crónica e desregulada (Hanahan *et al.* 2011).

A avaliação da proliferação celular tem-se mostrado útil para a previsão do comportamento biológico e potencial malignidade dos tumores (Sarli *et al.* 2002). Os métodos de IHQ são os mais utilizados na sua avaliação pois esta insere-se num contexto morfológico, o que permite identificar facilmente a população tumoral e diferenciá-la dos tecidos normais adjacentes, obtendo-se assim informações mais precisas acerca da atividade cinética exclusiva das células neoplásicas. A taxa de proliferação determinada por IHQ pode também ser importante na determinação da susceptibilidade do tumor à quimioterapia, uma vez que a maioria dos fármacos antineoplásicos atua em células que se encontram em divisão celular. Tumores com alto índice proliferativo são mais sensíveis a estes fármacos (Abadie *et al.* 1999). Quanto maior a atividade proliferativa de um tumor, pior será o seu comportamento biológico (Weidner *et al.* 1994).

O crescimento de uma massa tumoral deve-se, não só ao aumento da taxa de proliferação, mas também à diminuição da taxa de morte celular, podendo esta resultar da diminuição de células em apoptose (Carson & Ribeiro 1993; González-Cámpora *et al.* 2000).

O anticorpo anti-Ki-67 é um dos principais marcadores imunohistoquímicos utilizados para avaliar a atividade proliferativa de um tumor (Dias Pereira *et al.* 2004) e existem evidências de que a sua marcação apresenta boa correlação com outros marcadores de proliferação celular (Hall *et al.* 1990).

O anticorpo monoclonal anti-Ki-67 descrito inicialmente por Gerdes *et al.* (1993) era utilizado apenas em cortes histológicos congelados ou centrifugados. A pesquisa da proteína Ki-67 em tecidos fixados em formol e incluídos em parafina começou a ser realizada com a introdução do anticorpo monoclonal MIB-1 que reconhece o epítipo do antígeno Ki-67 (Lee *et al.* 2004; Cattorretti *et al.* 1992).

O Ki-67 é um marcador capaz de reconhecer uma proteína nuclear com peso molecular de 345 a 395 kDa (Gerdes *et al.* 1983; Ermiah *et al.* 2012) cuja expressão está associada à proliferação celular, encontrando-se presente durante as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e M) e estando ausente nas células quiescentes (G0) (Gerdes *et al.* 1983). O Ki-67 começa a ser expresso na fase S, aumentando a sua expressão durante as fases S e G2, tendo o seu nível mais elevado durante a mitose. Após a divisão, as células retornam à fase G1 e o nível de Ki-67 diminui progressivamente (Gerdes *et al.* 1983).

Valores aumentados de Ki-67 têm correlação positiva com metástases, morte devido à neoplasia e menor esperança de vida (Peña *et al.* 1998).

O anticorpo anti-Ki-67 é um marcador imunohistoquímico seguro, rápido e surge como um bom indicador do grau de agressividade tumoral. Vários autores referem o Ki-67

como sendo um ótimo marcador de proliferação celular no diagnóstico e prognóstico de carcinomas mamários caninos (Faustino 1999; Sarli *et al.* 2002; Santos *et al.* 2013) bem como para o cancro de mama da mulher (Weidner *et al.* 1994; Sirvent *et al.* 1995, Ermiah *et al.* 2012).

APOPTOSE E CASPASE-3

A apoptose é um processo fisiológico altamente regulado de morte celular programada e desempenha um papel relevante na homeostasia de diferentes tecidos em resposta a vários estímulos (Thompson 1995). Este processo é fundamental para o normal funcionamento dos organismos multicelulares, uma vez que o número de células que constitui um órgão é determinado a partir das taxas de migração celular, divisão e morte celular (Strasser *et al.* 2000; Igney *et al.* 2002).

O processo de apoptose é caracterizado por várias alterações morfológicas e bioquímicas das células e é de crucial importância para o desenvolvimento embrionário, maturação do sistema imune, defesa contra infecções virais e exerce um papel como barreira natural contra o desenvolvimento tumoral (Bras *et al.* 2005). A apoptose é caracterizada por uma série de particularidades morfológicas e bioquímicas intracelulares altamente reguladas, em que as células destinadas a “morrer” ativam enzimas que degradam o seu DNA nuclear e as suas proteínas citoplasmáticas (Elmore 2007).

Durante a apoptose ocorrem alterações na morfologia celular que incluem condensação do núcleo e da cromatina, seguidas por contração celular e formação de vesículas sem perda de membrana e sem reação inflamatória associada (Liao *et al.* 2005) pois as células apoptóticas não libertam os seus constituintes para o espaço intersticial. Estes constituintes são rapidamente fagocitados por células vizinhas, evitando assim a necrose secundária e a libertação de citocinas (Kurosaka *et al.* 2003).

Existem duas vias que induzem a apoptose: via extrínseca – mediada pela ativação de recetores de morte celular localizados na membrana citoplasmática; via intrínseca – mediada pela mitocôndria (Igney *et al.* 2002), onde há libertação de fatores indutores de apoptose como o citocromo c, AIF (apoptosis inducing factor), ATP e proteínas de choque térmico. Proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas da família do bcl-2 regulam a via mitocondrial (Loro *et al.* 2003; Fisher 2001). Em ambas as vias, o início do processo apoptótico é rigidamente controlado por numerosos sinais capazes de induzir a morte celular programada. Este processo celular está intimamente ligado à ação de proteases denominadas caspases, que ativam e clivam substratos celulares, levando a alterações bioquímicas e morfológicas, características do processo de apoptose (Igney *et al.* 2002). As caspases são proteases, grupo de enzimas proteolíticas (cystenil aspartate specific

proteases) que utilizam a cisteína como grupo nucleofílico na clivagem de substratos levando à apoptose (Chang *et al.* 2000; Grutter 2000).

O processo apoptótico pode ser dividido em duas fases: fase de iniciação e fase de execução (Thompson 1995; Kroemer *et al.* 1995). A fase de iniciação é dependente do estímulo recebido pela célula por via endógena ou por recetores de superfície. Stress oxidativo, hipóxia, erros de DNA, presença de citocinas e desregulação do equilíbrio iónico são alguns dos exemplos de condições que podem desencadear a apoptose. Durante a fase de execução há ativação da cascata das caspases e a célula adquire características bioquímicas e morfológicas típicas deste processo (Green & Kroemer 1998). A célula diminui o seu volume, ocorre condensação da cromatina e cariorréxis culminando na formação de corpos apoptóticos (Kroemer *et al.* 2007; Hail *et al.* 2006).

Os mecanismos que regulam a proliferação e morte celular estão relacionados com as transformações moleculares operadas nas células que constituem um tumor (Igney *et al.* 2002). As alterações nos genes que regulam a apoptose levam a um aumento do número de células neoplásicas pois induzem uma elevada taxa de crescimento celular e uma diminuição nos níveis de morte das células transformadas (Igney *et al.* 2002). Estas alterações levam a um descontrolo entre proliferação de células tumorais e a capacidade individual destas células se autodestruírem (De Jong *et al.* 2000).

Há uma variedade de mecanismos utilizados pelas células neoplásicas para suprimir a apoptose. As células tumorais podem adquirir resistência à apoptose pela expressão de proteínas anti-apoptóticas ou pela regulação ou mutação de proteínas pró-apoptóticas (Igney *et al.* 2003; Elmore 2007). Pensa-se que a supressão da apoptose durante a carcinogénese tem um papel crucial no desenvolvimento e progressão de determinados tumores (Kerr *et al.* 1994; Hanahan *et al.* 2011).

As caspases são cruciais para a execução do processo apoptótico, tendo sido já identificadas catorze caspases, todas com propriedades comuns (Loro *et al.* 2003; Fan *et al.* 2005). As caspases são divididas em dois grupos: iniciadoras e efetoras, de acordo com a ordem de ativação durante a apoptose (Fischer 2001). Depois de uma caspase iniciadora ser ativada, o processo de morte enzimática é iniciado pela ativação rápida e sequencial de outras caspases e desta forma são desencadeados os processos nucleares e citoplasmáticos que levam à morte celular programada (Nakopoulou *et al.* 2001). A caspase-8 e a caspase-9 pertencem ao grupo das iniciadoras. Várias caspases, tais como a caspase-3 e a caspase-6 fazem parte do grupo das efetoras (Fischer 2001). A caspase-3 tem sido alvo de diversos estudos relacionados com a apoptose, tornando-se uma peça chave no entendimento dos mecanismos de morte celular, uma vez que é ativada em resposta a vários estímulos. Esta protease tem sido um dos marcadores tumorais mais estudados na pesquisa sobre os mecanismos apoptóticos devido à sua localização na

cascatas das proteases, representando quer a via intrínseca como a via extrínseca (Nakopoulou *et al.* 2001). A caspase-3 é responsável pela clivagem de vários substratos celulares, incluindo as proteínas estruturais e enzimas de reparação de DNA. Por outro lado, é responsável também pela ativação de uma endonuclease - DNase caspase-ativada - que provoca fragmentação do DNA típica da apoptose (O'Donovan *et al.* 2003). A caspase-3 foi identificada em vários tecidos normais e diversos estudos têm demonstrado que a sua expressão está relacionada com a evolução clínica de uma série de neoplasias (Kumamoto *et al.* 2001; Tobón-Arroyave *et al.* 2004). A marcação imunohistoquímica da caspase-3 é um método muito utilizado para o estudo da apoptose. Devido à ampla expressão da caspase-3 e à sua função na regulação da vida e morte de vários tipos celulares, estudos recentes defendem que a taxa de expressão desta proteína em neoplasias malignas está relacionada com a progressão tumoral (Vakkala *et al.* 1999). Esta protease desempenha um papel crucial no mecanismo apoptótico dos carcinomas mamários, sendo um valioso indicador prognóstico para estes tumores (Nakopoulou *et al.* 2001).

Publicações anteriores demonstraram que o índice apoptótico em vários tipos de tumores se encontra associado com a proliferação celular, sugerindo que existe uma ligação entre estes dois eventos (Soini *et al.* 1998). Em carcinomas mamários da mulher, valores elevados de apoptose estão associados a prognóstico desfavorável e a tumores de grau histológico elevado (Soini *et al.* 1998; De Jong *et al.* 2000; Parton *et al.* 2002).

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste estudo foram selecionados 45 amostras de carcinomas mamários simples de cadela e respetivas metástases ganglionares (n=14), recebidos no período compreendido entre Fevereiro de 2009 e Setembro de 2013 no âmbito do serviço de diagnóstico histopatológico prestado pelo laboratório de Patologia Veterinária do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar. Para além das amostras de carcinomas mamários, foram também incluídas amostras de tecido mamário normal (n=5) provenientes de necrópsias realizadas nas aulas práticas de Anatomia Patológica I.

Os tecidos foram fixados em formol tamponado a 10% e incluídos em parafina. Foram efetuados cortes histológicos seriados, com uma espessura de 3µm para coloração de Hematoxilina-eosina (HE) e para o estudo imunohistoquímico. O diagnóstico histopatológico foi realizado por dois patologistas, baseados na mais recente classificação, proposta pela OMS, dos tumores mamários de canídeos (Misdorp *et al.* 1999).

Os carcinomas selecionados foram ainda avaliados em relação ao grau histológico de acordo com o método de Nottingham (Elston & Ellis 1996) que se baseia na avaliação das seguintes características morfológicas:

- (1) Formação de túbulos;
- (2) Pleomorfismo nuclear;
- (3) Atividade mitótica avaliada em 10 campos de grande ampliação.

A cada um destes parâmetros foi atribuída uma pontuação de 1 a 3 (Tabela 1) cuja soma final permitiu estimar o grau de malignidade dos tumores:

- 3-5 pontos = grau 1 (tumor bem diferenciado)
- 6-7 pontos = grau 2 (tumor moderadamente diferenciado)
- 8-9 pontos = grau 3 (tumor pouco diferenciado)

Critério Histológico	Pontuação
Formação de túbulos	
Em mais de 75% da área do tumor	1
Em 10 a 75% da área do tumor	2
Em menos de 10% da área do tumor	3
Pleomorfismo Nuclear	
Núcleos pequenos e uniformes	1
Núcleos aumentados de tamanho, com variações na forma	2
Grande variabilidade na dimensão e forma dos núcleos	3
Número de mitoses (10 HPF*)	
0-8	1
9-17	2
>18	3

Tabela 1. Determinação do grau histológico através do método de Nottingham.

*Valor estimado para microscópio Nikon Eclipse 600, com diâmetro de campo de observação de 0,55 mm na ampliação de 40x.

No estudo imunohistoquímico foram utilizados os seguintes anticorpos primários: Anticorpo monoclonal anti-Ki-67 (Clone MIB-1, Dako, Denmark) e Anticorpo Anti-active Caspase 3 (Abcam, UK) cuja especificidade e diluições utilizadas se encontram sumariadas na Tabela 2.

Anticorpo	Clone	Tipo	Especificidade	Diluição	Origem
Anti-Ki-67	MIB-1	Monoclonal	Ki-67	1:50	Dako
Anti-active Caspase 3 (ab13847)		Policlonal	Caspase-3	1:8000	Abcam

Tabela 2. Anticorpos utilizados neste estudo e suas características.

No caso do anticorpo anti-Ki-67, o controlo positivo consistiu na utilização de uma amostra de amígdala humana, de acordo com as indicações do fabricante. Como controlo negativo foram utilizadas secções histológicas do mesmo tecido usado como controlo positivo, sendo o anticorpo substituído por soro de IgG1. Para a Caspase-3 foi utilizada como controlo positivo uma amostra de um gânglio linfático normal; como controlo negativo foi utilizado o mesmo tecido usado como controlo positivo, substituindo o anticorpo por soro de IgG1.

O método de detecção usado foi o NovoLink Polymer Detection System (Novocastra, Newcastle, UK). Para as secções de tecido destinadas à IHC foram utilizadas lâminas revestidas com APES (3-aminopropyltriethoxysilane), desparafinadas em xilol e reidratadas numa série de álcoois em concentrações decrescentes. Posteriormente estas secções foram lavadas em água corrente sendo depois sujeitas a recuperação antigénica. No caso do anticorpo monoclonal anti-Ki-67, a recuperação antigénica foi realizada utilizando tampão citrato 10mM a pH=6.0, em panela de pressão, durante 3 minutos (Carson 1990). Para o anticorpo Anti-active Caspase-3, a recuperação antigénica realizou-se com tampão citrato 10 mM a pH=6.0, em banho-maria à T de ~ 99°C, durante 30 minutos. Após este período, as secções foram retiradas do banho-maria e deixadas a arrefecer à temperatura ambiente.

Depois de preparada uma câmara húmida, procedeu-se ao bloqueio da peroxidase endógena pelo Kit Novolink. Seguiu-se uma dupla lavagem em TBS de 5 minutos cada. Posteriormente, procedeu-se à incubação do *Protein Block*, durante 5 minutos. No final deste tempo, o excesso de *Protein Block* foi removido, sendo incubados os diferentes anticorpos primários (diluídos em BSA a 5%), à temperatura de 4°C durante 16 horas.

Decorrido o tempo de incubação, os cortes foram sujeitos novamente a dupla lavagem em TBS, cada uma com a duração de 5 minutos, sendo depois incubados com a solução de *Post Primary Block*, durante 30 minutos, à temperatura ambiente. Após novas lavagens com TBS, as preparações foram incubadas com *Polymer*, durante 30 minutos, à temperatura ambiente. Seguiram-se mais duas lavagens com TBS e posteriormente a reação foi revelada com o cromogéneo-3,3-diaminobenzidina (DAB), tendo-se utilizado 50µl de DAB por cada 1000 µl de *Substrate Buffer*. Estes cortes foram, de seguida, lavados e contrastados com Hematoxilina. Por último, os cortes foram desidratados numa

série de álcoois em concentrações crescentes e mergulhados em duas soluções de xilol. As lâminas foram montadas com Entellan (Entellan Neu, Merck, Germany) – meio de montagem comercial.

No caso do anticorpo MIB-1, a reação foi considerada positiva na presença de um precipitado nuclear de coloração acastanhada, independentemente da sua intensidade. Para o anticorpo Anti-active Caspase-3, a reação foi considerada positiva na presença de um precipitado acastanhado citoplasmático, também independentemente da sua intensidade. Esporadicamente foi visualizada marcação nuclear das células marcadas.

Para a avaliação do Ki-67 foi utilizado um método quantitativo, baseado na contagem de 100 células em 10 campos de grande ampliação, perfazendo um total de 1000 células por cada caso. Foram selecionados campos histológicos da periferia das lesões, associados a uma atividade proliferativa mais intensa (Dias Pereira *et al.* 2004) e evitadas áreas de necrose e inflamação. A contagem foi realizada com recurso a uma ocular com retículo e obedecendo a uma sequência sistemática pré-definida. O número de células positivas por 1000 células foi expresso em percentagem (MIB-1 index).

Para a avaliação da apoptose foram contados 10 campos onde, com a objetiva de 40x, a atividade demonstrava ser maior (“hotspots”). Após a contagem das células marcadas nos 10 campos observados, foi calculada a média de células positivas, por campo.

A análise estatística dos resultados foi realizada com a aplicação de técnicas de análise de variância recorrendo ao software SAS *proc GLM*. De forma a garantir normalidade na amostra e a ser possível realizar inferências estatísticas, no caso da caspase-3, foram omitidos 4 casos/extremos que comprometiam a distribuição normal da amostra. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

O material recolhido para este trabalho incluía 5 amostras de glândula mamária canina normal e 45 neoplasias mamárias malignas de diferentes tipos histológicos, das quais 14 apresentavam metástases ganglionares (Tabela 3).

Diagnóstico Histopatológico	Nº de casos
Mama normal	5
Carcinoma tubulopapilar	24
Carcinoma sólido	18
Carcinoma anaplásico	3
Metástases ganglionares	14

Tabela 3. Diagnóstico histopatológico das amostras de tecido mamário canino, segundo os critérios definidos pela OMS (Misdorp, 1999).

GRAU HISTOLÓGICO

Dos 45 carcinomas mamários caninos incluídos neste estudo 14 (31,1%) foram classificados como de grau I, 16 (35,6%) foram classificados como de grau II e 15 (33,3%) como de grau III (tabela 4). As metástases ganglionares incluídas neste estudo eram provenientes dos carcinomas de grau III.

Tipo Histológico	Nº de casos	Grau Histológico		
		Grau I	Grau II	Grau III
Carcinoma Tubulopapilar	24	11	9	4
Carcinoma Sólido	18	3	6	9
Carcinoma Anaplásico	3	0	1	2
Total	45	14	16	15

Tabela 4. Distribuição do número de casos em função do tipo e grau histológico dos carcinomas mamários.

IMUNOEXPRESSÃO DO KI-67 E DA CASPASE-3 EM TECIDO MAMÁRIO CANINO

IMUNOEXPRESSÃO DO KI-67

Tecido mamário normal

No tecido glandular mamário normal verificou-se que a imunoreatividade ao anticorpo MIB-1 era reduzida, variando entre 0,4 e 4,1%, com um valor médio de 2,34% ($\pm 1,58DP$). A marcação ocorreu principalmente a nível do epitélio luminal, concentrando-se nas estruturas alveolares, sendo menos frequente a nível ductal (Figura 1).

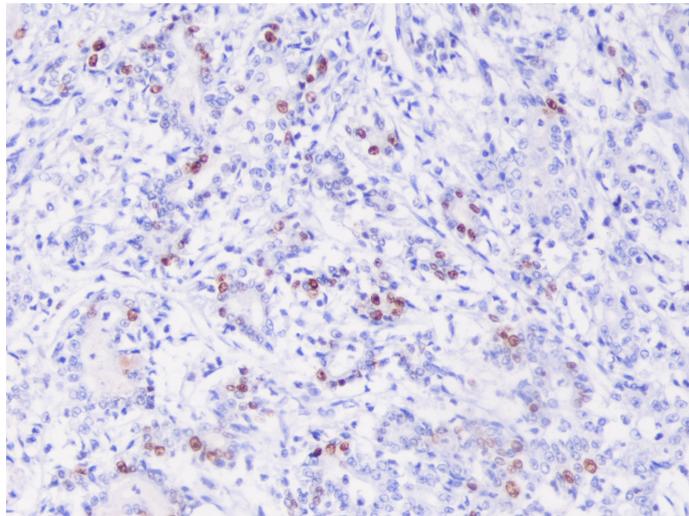


Figura 1. Glândula mamária normal (200x). Marcação nuclear do MIB-1 presente nas células epiteliais luminiais.

Neoplasias malignas

Verificou-se que a imunoreatividade ao anticorpo MIB-1 variava entre 3,1 % e 42,9 %, tendo sido registado um valor médio de 21,2 % ($\pm 9,94$ DP). (Tabela 5)

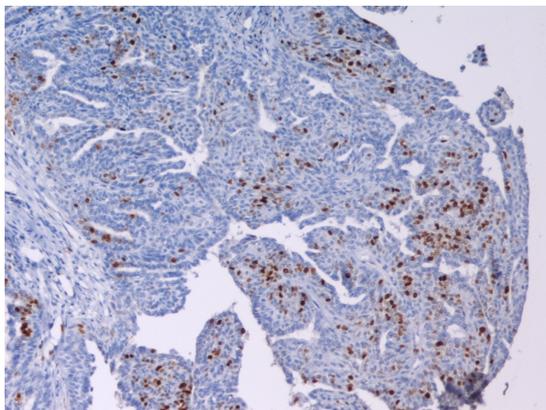


Figura 2. CTP de grau I (100x). Marcação da população epitelial com o anticorpo MIB-1.

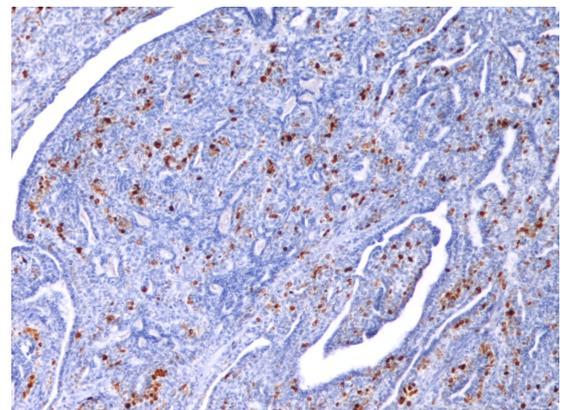


Figura 3. CS de grau I (100x). Marcação da população epitelial com o anticorpo MIB-1.

As diferenças na atividade proliferativa dos diversos tipos histológicos de carcinoma foram discretas (Figura 2 e 3); efetivamente, nos carcinomas tubulopapilares (CTP) obteve-se um valor médio de 19,95% ($\pm 2,05$ DP), nos carcinomas sólidos (CS) de 22,46% ($\pm 2,37$ DP) e nos anaplásicos (CA) de 24,33% ($\pm 5,81$ DP). Já nos diversos graus histológicos pôde observar-se algumas diferenças consideráveis; nos carcinomas de Grau

I a atividade proliferativa registou um valor médio de 14,37% ($\pm 2,31$ DP), nos carcinomas de Grau II de 21,64% ($\pm 2,16$ DP) e nos de Grau III de 27,23% ($\pm 2,23$ DP) (Figura 4).

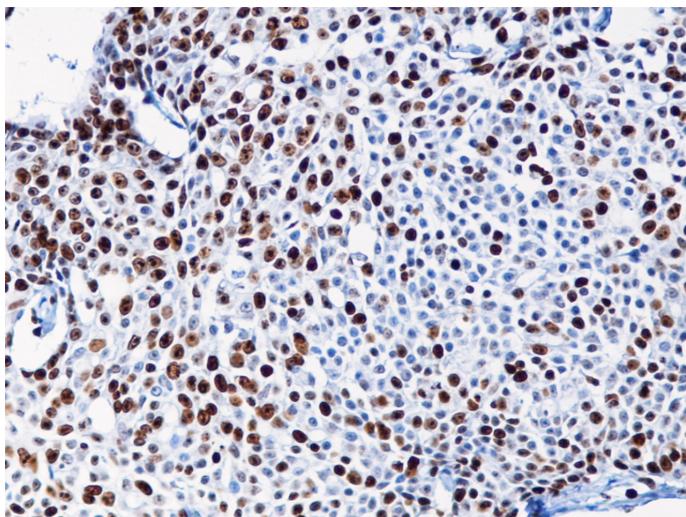


Figura 4. CS de grau III (200x). Elevada marcação da população epitelial com o MIB-1.

Diagnóstico	MIB-1	Caspase-3
	(%) Média \pm Desvio padrão Intervalo de variação	(células por campo) Média \pm Desvio padrão Intervalo de variação
Mama Normal	2,34 \pm 1,58 (0,4-4,1)	6,42 \pm 7,38 (2,5-19,6)
CTP	19,95 \pm 2,05 (3,1-42,9)	3,67 \pm 0,42 (0,4-6,7)
CS	22,46 \pm 2,37 (9,7-40,1)	3,56 \pm 0,52 (0,5-7,7)
CA	24,33 \pm 5,81 (6,2-29,3)	4,27 \pm 1,16 (3,1-6,2)
Grau I	14,37 \pm 2,31 (3,1-25,2)	2,4 \pm 0,45 (0,4-6,6)
Grau II	21,64 \pm 2,16 (9-37,6)	3,76 \pm 0,42 (0,5-6,7)
Grau III	27,23 \pm 2,23 (11,2-42,9)	5,15 \pm 0,51 (1,4-7,7)

Tabela 5. Avaliação da atividade proliferativa e apoptose do tecido mamário canino normal e neoplásico, através da expressão dos anticorpos MIB-1 e Caspase-3.

Em nove das catorze metástases ganglionares observadas (64,29%), foi possível observar uma diminuição da fração de células neoplásicas marcadas para o MIB-1 relativamente aos valores encontrados nos respetivos tumores primários; nas restantes

cinco (35,71%) houve um aumento no número de células neoplásicas marcadas, comparativamente ao tumor primário (Figura 5 e 6).

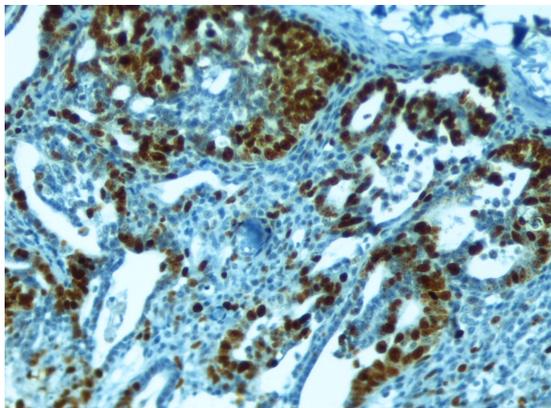


Figura 5. Tumor primário: CTP de grau III (200x). Marcação da população epitelial com o anticorpo MIB-1.

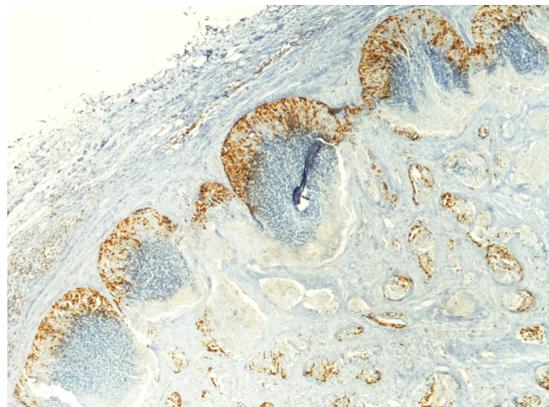


Figura 6. Metástase ganglionar do carcinoma da figura 5 (40x). Observou-se número de células marcadas superior à lesão original. Marcação com o anticorpo MIB-1.

IMUNOEXPRESSÃO DA CASPASE-3

Tecido mamário normal

Nas amostras de tecido mamário normal, verificou-se que a imunoreatividade à Caspase-3 variou entre 3 e 19,6 células por campo, com um valor médio de 6,42 ($\pm 7,38$ DP). A marcação, que interessava o epitélio luminal e as células mioepiteliais, concentrava-se nas estruturas alveolares (Figura 7).

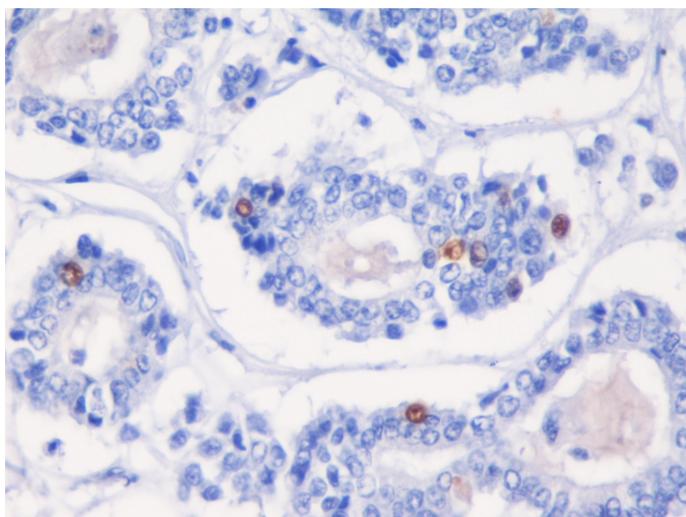


Figura 7. Glândula mamária normal (200x). Marcação com o anticorpo anti-active caspase-3.

Neoplasias malignas

Nos carcinomas avaliados verificou-se que a imunoreatividade à Caspase-3 variava de 0,4 a 7,7 células/campo, tendo-se registado um valor médio de 3,67 células/campo ($\pm 1,97$ DP). As diferenças na apoptose dos diversos tipos histológicos de carcinoma foram muito ténues; nos CTP obteve-se um valor médio de 3,67 células/campo ($\pm 0,42$ DP), nos CS de 3,56 células/campo ($\pm 0,52$ DP) (Figura 8) e nos CA de 4,27 células/campo ($\pm 1,16$ DP). Relativamente ao grau histológico, foi possível observar que os carcinomas de Grau I apresentavam um valor médio de células em apoptose de 2,4 células/campo ($\pm 0,45$ DP), os carcinomas de Grau II de 3,76 células/campo ($\pm 0,42$ DP) e os de Grau III de 5,15 células/campo ($\pm 0,51$ DP) (Figura 8).

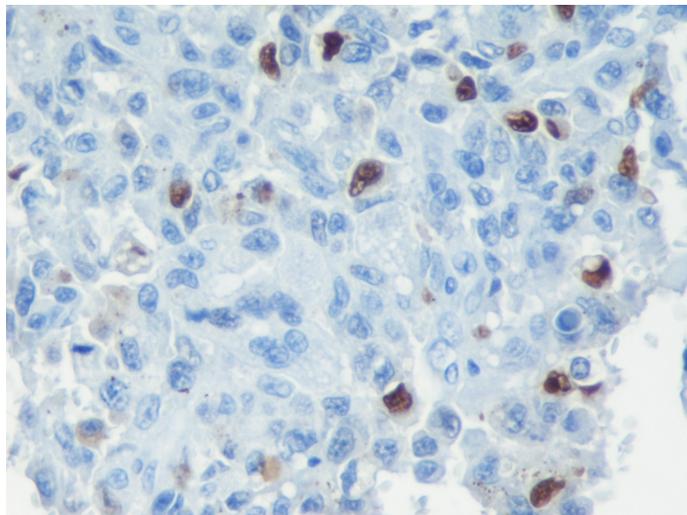


Figura 8. CS de grau III (400x). Marcação elevada da caspase-3 nas células epiteliais luminiais.

Nas catorze metástases ganglionares de carcinomas analisadas, sete casos (50%) registaram uma diminuição da fração de células neoplásicas marcadas para a caspase-3 relativamente aos valores encontrados nos respetivos tumores primários (Figura 9 e 10); as restantes sete metástases observadas registaram um aumento da fração neoplásica comparativamente ao tumor primário.

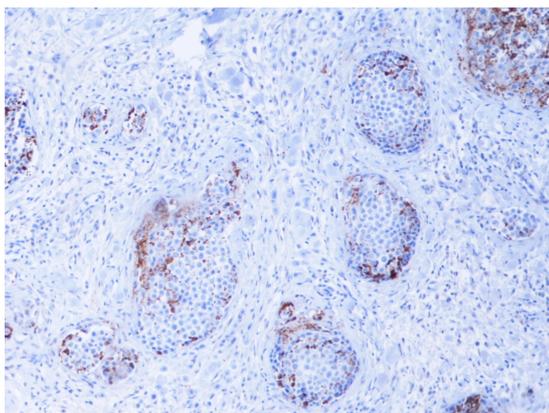


Figura 9. Tumor primário: CA de grau III (100x). Marcação elevada da caspase-3.

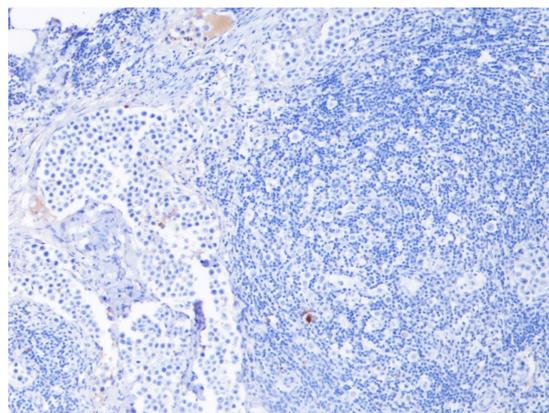


Figura 10. Metástase ganglionar de CA (100x). Observou-se um número inferior de células marcadas com a caspase-3 relativamente ao tumor primário.

DISCUSSÃO

A avaliação da atividade proliferativa é de extrema importância para a compreensão do comportamento biológico dos carcinomas e para prever o comportamento clinicopatológico e evolução dos tumores (Xiao *et al.* 2013). O MIB-1 é um dos marcadores mais estudados na carcinogénese mamária. Este anticorpo monoclonal reconhece o epítipo do antígeno Ki-67 em tecidos fixados em formol e incluídos em blocos de parafina (Cattorretti *et al.* 1992).

Nos últimos anos, vários estudos foram realizados sobre o processo de apoptose e a sua associação com o crescimento e progressão tumoral (Soini *et al.* 1998). A apoptose, sendo um processo de morte celular programada, é um mecanismo perfeitamente regulado responsável por remover células que se encontrem danificadas ou disfuncionais. Na presença de sinais que evidenciem que possa existir danos celulares, as caspases são ativadas tendo como objetivo final a eliminação da célula danificada. A caspase-3 é um membro desta família de proteases e está presente numa variedade de tecidos, incluindo a glândula mamária (Hadjiloucas *et al.* 2001). A avaliação da apoptose é, portanto, de grande interesse para a análise da cinética tumoral, do comportamento biológico das lesões e prognóstico da doença clínica (Maciorowski *et al.* 2001; Schöndorf *et al.* 2004).

Neste sentido decidiu-se investigar a atividade proliferativa e a apoptose em carcinomas mamários caninos através do estudo da expressão imunohistoquímica do Ki-67 e da Caspase-3.

Relativamente à atividade proliferativa, os resultados obtidos com este trabalho revelaram um aumento gradual nos valores médios de marcação para o MIB-1, partindo do tecido mamário normal e culminando nos carcinomas de grau III.

No tecido mamário normal foi possível verificar que a atividade proliferativa era reduzida nas células epiteliais lúminais e mioepiteliais, à semelhança dos resultados

apresentados em estudos similares (Faustino 1999; Geraldles *et al.* 2000). Num dos casos estudados, a imunoreatividade ao anticorpo MIB-1 foi extremamente reduzida (0,4%), o que poderá estar relacionado com as variações descritas na atividade proliferativa no decorrer das diferentes fases do ciclo éstrico (Rudland 1991). Era possível observar involução marcada das estruturas ductais (Figura 11) e alveolares da glândula, diminuição da espessura do epitélio ductal, colapso dos alvéolos (Figura 12), passagem de células epiteliais para o lúmen alveolar, vacuolização epitelial e diminuição da atividade proliferativa. Todas estas características estão descritas como sendo específicas de uma fase de regressão do ciclo éstrico da cadela, mais concretamente do anestro em fase inicial (Santos *et al.* 2010).



Figura 11. Glândula mamária normal (100x).
Involução marcada dos ductos. HE

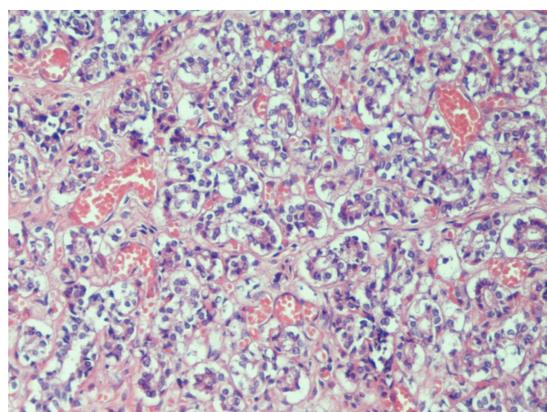


Figura 12. Glândula mamária normal (200x).
Colapso alveolar. HE

Nos restantes casos, a marcação apresentava valores ligeiramente superiores e concentrava-se nas estruturas alveolares, à semelhança de outros estudos elaborados anteriormente (Rudland 1991; Russo *et al.* 1999).

Foram realizadas comparações entre a atividade proliferativa nos diferentes graus e tipos histológicos de carcinoma mamário canino, cujos resultados se encontram sumariados na tabela 6.

Parâmetro	Contraste ± Erro-Padrão (%)
Carcinoma Grau II vs Carcinoma Grau I	7,27±3,17*
Carcinoma Grau III vs Carcinoma Grau I	12,86±3,22**
Carcinoma Grau III vs Carcinoma Grau II	5,60±3,11
Carcinoma sólido vs Carcinoma tubulopapilar	2,51±3,14
Carcinoma anaplásico vs Carcinoma tubulopapilar	4,39±6,16
Carcinoma anaplásico vs Carcinoma sólido	1,88±6,27

Tabela 6. Diferença e significância estatística entre a atividade proliferativa (percentagem de células marcadas com o anticorpo MIB-1) nos diferentes graus e tipos histológicos de carcinomas mamários caninos.

*p<0,05

**p<0,01

Os carcinomas tubulopapilares, sólidos e anaplásicos apresentavam um índice de proliferação médio de 19,95%, 22,45% e 24,33%, respetivamente. Não foi encontrada uma associação estatisticamente significativa ($p=0,63$) entre a atividade proliferativa e o tipo histológico dos carcinomas estudados, à semelhança de estudos realizados anteriormente em carcinomas mamários de gatas (Dias Pereira *et al.* 2003) e de cadelas (Santos *et al.* 2013). Estes resultados demonstram que provavelmente, a forma como as células se organizam num tumor não depende da sua capacidade de proliferar.

Foi possível estabelecer uma associação estatisticamente significativa ($p=0,001$) entre a atividade proliferativa e o grau histológico dos carcinomas, tal como em estudos anteriores realizados em carcinomas mamários caninos (Matos *et al.* 2006). Foi também possível verificar que a atividade proliferativa dos carcinomas de grau I (tumores bem diferenciados) era significativamente inferior ($p=0,02$) à dos carcinomas de grau II (tumores moderadamente diferenciados) e de grau III (tumores pouco diferenciados) ($p=0,0003$). Não foi encontrada uma associação estatisticamente significativa entre a atividade proliferativa dos tumores de grau II e os tumores de grau III ($p=0,0792$), sugerindo que não existem diferenças suficientes na capacidade de proliferação dos carcinomas analisados para os separar em graus distintos.

Foi também avaliada a relação entre a marcação imunohistoquímica com o Ki-67 e os diferentes critérios morfológicos tidos em conta no método de Nottingham (Elston & Ellis 1996): formação tubular, pleomorfismo nuclear e número de mitoses em 10 campos de grande ampliação. Os resultados encontram-se sumariados na tabela 7.

Critérios utilizados no método de Nottingham	Ki-67 Contraste±Erro-Padrão	Caspase-3 Contraste±Erro-Padrão
Túbulos		
Pontuação 2 vs Pontuação 1	5,92±4,47	1,33±0,90
Pontuação 3 vs Pontuação 1	8,90±4,67	1,58±0,95
Pontuação 3 vs Pontuação 2	2,98±3,18	0,25±0,67
Pleomorfismo Nuclear		
Pontuação 2 vs Pontuação 1	5,88±3,51	1,87±0,68
Pontuação 3 vs Pontuação 1	11,61±3,97**	2,64±0,79
Pontuação 3 vs Pontuação 2	5,73±3,30*	0,77±0,68
Mitoses		
Pontuação 2 vs Pontuação 1	6,86±3,33*	0,86±0,65
Pontuação 3 vs Pontuação 1	9,54±3,39**	2,22±0,73**
Pontuação 3 vs Pontuação 2	2,68±3,44	1,37±0,74

Tabela 7. Diferença e significância estatística entre a atividade proliferativa e apoptótica nos 3 parâmetros utilizados no Método de Nottingham.

*p<0,05

**p<0,01

Não foi encontrada uma associação estatisticamente significativa ($p=0,17$) entre a atividade proliferativa e a formação de túbulos. Em relação ao pleomorfismo nuclear foi possível verificar que existe uma associação estatisticamente significativa ($p=0,02$) entre a atividade proliferativa e este critério histológico. Foi verificado que a atividade proliferativa dos carcinomas constituídos por células com núcleos pequenos e uniformes (1) era significativamente inferior ($p=0,005$) à dos carcinomas constituídos por células que apresentavam elevada variabilidade na dimensão e forma dos núcleos (3).

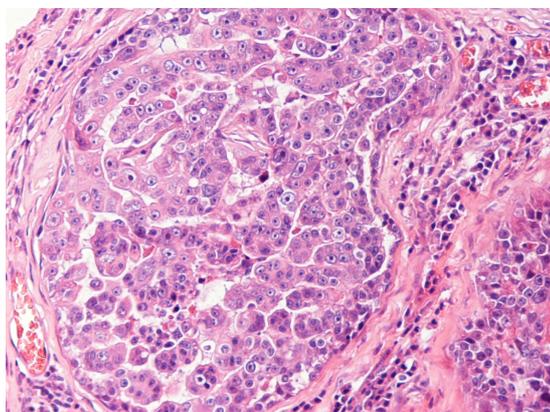


Figura 13. CTP de grau III com elevado pleomorfismo nuclear (200x). HE

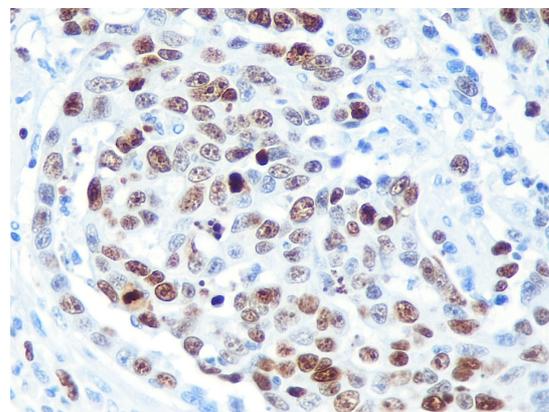


Figura 14. Marcação pelo MIB-1 de CS de grau III com elevado pleomorfismo nuclear (200x).

Por último, considerando o número de mitoses, foi possível confirmar que existia uma associação estatisticamente significativa ($p=0,02$) com a atividade proliferativa dos carcinomas determinada por imunohistoquímica, sugerindo que tanto o método de Nottingham como o estudo IHQ representam procedimentos válidos para inferir acerca da capacidade de proliferação de um tumor. Para além disso, foi também possível verificar que a atividade proliferativa dos carcinomas avaliada por imunohistoquímica considerados de reduzido índice mitótico de acordo com o método de Nottingham (0-8 mitoses) era significativamente inferior ($p=0,0458$) à dos carcinomas de moderado índice mitótico (9-17 mitoses), assim como era também significativamente inferior ($p=0,007$) à dos carcinomas de índice mitótico elevado (>18 mitoses). No entanto, não foi possível estabelecer uma associação estatisticamente significativa entre os carcinomas de índice mitótico moderado e os de índice elevado.

Relativamente à caspase-3 a marcação positiva foi pouco pronunciada nas áreas observadas quando comparada com o anticorpo anti-Ki-67. Foi possível constatar que a mama normal apresentava valores elevados de apoptose (6,42 células por campo). No entanto, este valor foi influenciado por um caso especial que apresentou uma média de 19,6 células por campo, revelando que várias células se encontravam em apoptose no momento em que a amostra foi colhida. Anteriormente este caso foi mencionado como tendo imunoreatividade extremamente reduzida ao anticorpo anti-Ki-67. Os achados encontrados, elevada apoptose e reduzida atividade proliferativa, reforçam a ideia de que a cadela em questão poderia encontrar-se numa fase inicial do anestro, devido à involução das estruturas alveolares e ductais glandulares e também às características regressivas proeminentes. Omitindo este caso, a mama normal apresentava um valor médio de 3,13 células por campo ($\pm 0,54$ DP) marcadas para a caspase-3.

Em relação ao tipo histológico, os carcinomas tubulopapilares, sólidos e anaplásicos apresentavam contagens de células em apoptose de 3,67 células/campo, 3,56 células/campo e 4,27 células/campo, respetivamente. Tal como observado com o anticorpo MIB-1, também não foi possível associar estatisticamente ($p=0,86$) o tipo histológico com a marcação com a caspase-3 (Tabela 8). Estes resultados demonstram que, provavelmente, os diferentes tipos histológicos de carcinomas apresentados são um grupo heterogéneo de neoplasias com índices apoptóticos distintos igualmente distribuídas entre os 3 grupos.

Parâmetro	Contraste±Erro-Padrão (%)
Carcinoma Grau II vs Carcinoma Grau I	1,36±0,62*
Carcinoma Grau III vs Carcinoma Grau I	2,75±0,68***
Carcinoma Grau III vs Carcinoma Grau II	1,39±0,66*
Carcinoma sólido vs Carcinoma tubulopapilar	0,10±0,67
Carcinoma anaplásico vs Carcinoma tubulopapilar	0,60±1,24
Carcinoma anaplásico vs Carcinoma sólido	0,71±1,28

Tabela 8. Diferença e significância estatística entre a apoptose (número de células marcadas com o anticorpo Caspase-3 por campo) nos diferentes graus e tipos histológicos de tecido mamário canino.

*p<0,05

***p<0,001

Foi avaliada a associação entre a apoptose e o grau histológico dos carcinomas em questão (Tabela 8). Esta avaliação permitiu concluir que existia uma associação estatisticamente significativa ($p=0,0011$) entre a apoptose e o grau histológico dos tumores corroborando os resultados já obtidos em carcinomas mamários de mulher (Frankfurt *et al.* 1997; De Jong *et al.* 2000; Hadjiloucas *et al.* 2001). Foi possível observar que a apoptose nos carcinomas bem diferenciados (grau I) era significativamente inferior ($p=0,03$) à dos carcinomas moderadamente diferenciados (grau II) e estes, por sua vez, apresentavam valores significativamente inferiores

($p=0,04$) à dos carcinomas pouco diferenciados (grau III) (Figura 15). Estes resultados indicam que se a neoplasia apresenta um crescimento rápido e um grau histológico elevado, o índice apoptótico também irá ser alto, sugerindo que a apoptose tende a acompanhar a evolução tumoral. O facto da apoptose se encontrar mais elevada em tumores de grau superior é um achado sugestivo de que estes

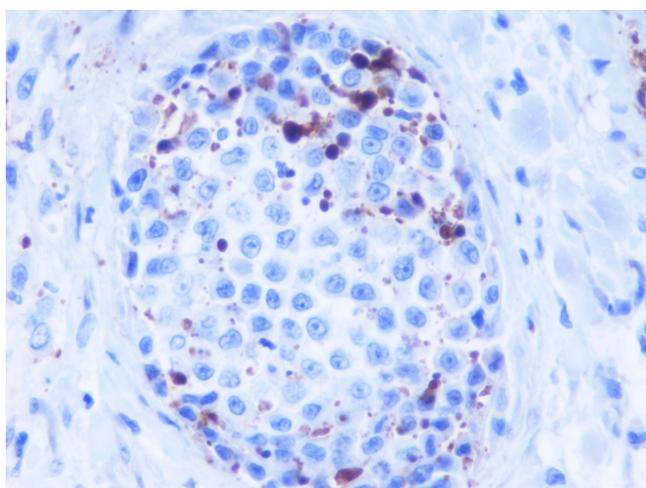


Figura 15. CA de grau III (400x). Marcação da população epitelial com o anticorpo anti-active caspase-3.

tecidos se encontram em constante renovação. O aumento na apoptose pode ser indicativo de instabilidade genómica que se manifesta à medida que o tumor mamário progride (Hadjiloucas *et al.* 2001). Vakkala *et al.* (1999) defendem que os genes que estão ativos em lesões de alto grau histológico são também responsáveis pela indução da apoptose nestes tumores. De facto, sabe-se que a expressão de vários genes tumorais, tais como o p53 e o c-erbB2, é superior em tumores de elevado grau histológico

comparativamente aos de baixo e moderado grau (Mack *et al.* 1997). Outra justificação para o aumento na apoptose em tumores de maior grau histológico reside na perda de recetores de estrogénio à medida que ocorre progressão tumoral. A estimulação estrogénica atua como inibidor da apoptose e quando esta é perdida, há um aumento do índice apoptótico (Frankfurt *et al.* 1997).

Assim como para o Ki-67, também foram feitas associações entre os critérios utilizados no método de Nottingham e a marcação com a caspase-3 (tabela 7). Em relação à formação de túbulos, também não foi possível encontrar uma associação estatisticamente significativa ($p=0,24$) com a apoptose. Por outro lado, foi encontrada uma associação estatisticamente significativa ($p=0,005$) entre o pleomorfismo nuclear e a fração de células em apoptose. De facto, os carcinomas que exibiam núcleos pequenos e uniformes apresentavam valores de apoptose significativamente inferiores ($p=0,008$) à dos carcinomas com moderado pleomorfismo nuclear. Não foi possível associar estatisticamente ($p=0,26$) os carcinomas de pleomorfismo moderado com os que apresentavam grande variabilidade na dimensão e forma nuclear. Foi avaliada a associação entre a apoptose e o número de mitoses, determinado de acordo com o método de Nottingham tendo-se observado uma associação estatisticamente significativa ($p=0,02$) entre ambos os parâmetros tal como em estudos anteriores realizados na mulher (De Jong *et al.* 2000). Isto quer dizer que os casos com maior atividade mitótica também são os que apresentam mais imagens de apoptose, sugerindo que quanto maior for a capacidade de divisão do tumor, maior será o número de células acometidas pela apoptose. Estes resultados sugerem que ambos os eventos partilham determinados reguladores genéticos (De Jong *et al.* 2000). Os proto-oncogenes c-erbB2e c-myc são dois elementos fulcrais neste processo de regulação. A expressão deste último está envolvida em ambos os eventos podendo, em determinadas situações, levar a um aumento da proliferação celular ou desencadear a apoptose (Gandhi *et al.* 1998).

Foi realizada a análise estatística da correlação entre a imunomarcação dos dois anticorpos nas células epiteliais dos carcinomas. Foi possível concluir que existe uma correlação positiva de 0,57, altamente significativa ($p<0,0001$) entre a apoptose e a proliferação celular, reforçando os resultados de estudos feitos anteriormente na mulher (Frankfurt *et al.* 1997; Gandhi *et al.* 1998; Parton *et al.* 2002) e na cadela (Terzian *et al.* 2007). Estes resultados indicam que a apoptose está diretamente relacionada com a atividade proliferativa, podendo mesmo, segundo alguns autores (Frankfurt *et al.* 1997; Gandhi *et al.* 1998), partilhar um mecanismo regulador comum. Os fatores de crescimento podem levar à ativação de oncogenes como o c-myc e o c-erbB2, que têm um papel fundamental na dupla via de apoptose e proliferação celular (Gandhi *et al.* 1998). Esta relação entre a apoptose e a proliferação celular pode também ser explicada como uma

tentativa da resposta imune em induzir a apoptose em células tumorais com a finalidade de supressão tumoral. Segundo Gandhi *et al.* (1998) a relação entre estes dois processos pode também estar relacionada com a perda dos mecanismos normais que controlam a morte celular como os receptores hormonais e a proteína bcl-2 que apresentam expressão no epitélio mamário normal mas que em tumores mamários indiferenciados diminuem ou perdem a sua expressão. A apoptose elevada é portanto um indicador da diminuição ou inibição da diferenciação celular. A ativação da morte celular programada contribui para a progressão tumoral pois facilita a seleção de células com maior capacidade de sobrevivência em condições de crescimento adversas, justificando a maior agressividade encontrada nos carcinomas com maiores índices apoptóticos (Frankfurt *et al.* 1997).

PERSPETIVAS FUTURAS

Os resultados deste trabalho acerca de um tema tão vasto, reforçam a importância da continuidade dos estudos relativos à carcinogénese mamária canina.

A amostra que faz parte deste estudo é reduzida, pelo que seria interessante aumentar o número de casos analisados, associado a um acompanhamento clínico periódico dos animais, no sentido de obter informações concretas relativas ao possível valor prognóstico dos resultados obtidos. Desta forma, é de extrema importância o incremento de pesquisas sobre os TMC, pois os resultados destes estudos podem beneficiar o tratamento desta patologia.

Neste estudo, foram apenas tidos em conta os carcinomas simples, seria também interessante alargar o estudo para outros tipos histológicos de tumores mamários malignos e analisar se estes resultados são igualmente observados. Abrangendo também tumores com envolvimento da população mioepitelial seria útil a aplicação do marcador imunohistoquímico p63 (expresso pelo mioepitélio mamário).

Seria também pertinente do ponto de vista científico ter em consideração outras características clinicopatológicas relativas ao animal tais como idade ao diagnóstico, tamanho do tumor, peso, terapias hormonais instauradas e estado reprodutivo de forma a poder associar estes dados com a progressão tumoral.

Seria interessante associar a este estudo, a imunohistoquímica de outros marcadores tumorais com valor prognóstico como receptores de estrogénio (RE), receptores de progesterona (RP) e c-erbB-2. Em relação a este último, a sua elevada expressão está envolvida na iniciação dos tumores de mama em humanos e, para além disso, atualmente são realizados tratamentos com o anticorpo monoclonal (Trastuzumabe)

que se liga com alta afinidade à proteína do HER2 (Cobleigh *et al.* 1998). Este facto sugere que pode haver a possibilidade de usar anticorpos anti-c-erbB2 no tratamento dos TMC.

Por último, de maneira a complementar esta investigação, era importante realizar o estudo imunohistoquímico da proteína bcl-2 que está relacionada com a inibição da apoptose e comparar os resultados obtidos com este trabalho.

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO DECORRER DO ESTÁGIO CURRICULAR

Durante o período de estágio realizado durante dezasseis semanas no Laboratório de Patologia Veterinária do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS) foi desenvolvido um projeto de investigação científica relativo à expressão de dois marcadores tumorais associados à atividade proliferativa e apoptose em carcinomas mamários caninos. Em paralelo com este projeto, tive oportunidade de acompanhar e participar nas necrópsias realizadas no âmbito das disciplinas de Anatomia Patológica I e II do MIMV. Fui também acompanhando a rotina do diagnóstico histopatológico, incluindo a recepção e registo das amostras recebidas, descrição das características macroscópicas do material, processamento histológico das amostras, avaliação microscópica das amostras e emissão do respetivo diagnóstico final.

BIBLIOGRAFIA

Abadie JJ, Amardeilh MA, Delverdier ME (1999) "Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs" **Journal of the American Veterinary Medical Association** 215 1629-1633

Beck J, Hennecke S, Bornemann-Kolatzki K, Urnovitz HB, Neumann S, Strobel P, Kaup FJ, Schutz E (2013) "Genome aberrations in canine mammary carcinomas and their detection in cell-free plasma DNA" **Plos One** 8, 1-16

Bostock DE (1986) "Canine and feline mammary neoplasms" **British Veterinary Journal** 142 (6), 506–515

Bras M, Queenan B, Susin SA (2005) "Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying" **Biochemistry (Mosc)**, 70, 231-239

Carson DA, Ribeiro JM (1993) "Apoptosis and disease" **Lancet** 341, 1251-1254

Carson FL (1990) "Histotechnology a self-introduction text", **ASCP Press** 12, 231-249

Cattorretti G, Becker MHG, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, Gerdes J (1992) "Monoclonal antibodies against parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections" **J. Pathol** 168, 357-363

Chang HY, Yang X (2000) "Proteases for cell suicide: functions and regulations of caspases" **Microbiol. Mol Biol. Rev.** 64, 821-846

Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Mendelsohn J et al. (1998) "Efficacy and safety of Herceptin as a single agent in 222 women with HER2 overexpression who relapsed following chemotherapy for metastatic breast cancer" **Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.** 17: 97a

De Jong JS, Van Diest PJ, Baak JA (2000) "Number of apoptotic cells as a prognostic marker in invasive breast cancer" **British Journal of Cancer** 82, 368-373

Dias Pereira P, Carvalheira J, Gartner F (2004) "Cell proliferation in feline normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissue – an immunohistochemical study" **The Veterinary Journal** 168, 180-185

Egenvall A, Bonnett BN, Ohagen P, Olson P, Hedhammar A, von Euler H (2005) "Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002" **Prev Vet Med** 13, 109–127

Elmore S (2007) "Apoptosis: a review of programmed cell death" **Toxicol Pathol.**, 4 495-516

Else RW, Hannant D (1979) "Some epidemiological aspects of mammary neoplasia in the bitch" **Vet Rec.** 104, 296-304

Elston CW, Ellis IO (1996) "Assessment of histological grade" **Rosen's Breast Pathology**, Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 365-382

Engingler SO, Akis I, Toydemir TSF, Oztabak K, Haktanir D, Gunduz MC, Kirsan I, Firat I (2013) "Genetic variations of BRCA1 and BRCA2 genes in dogs with mammary tumours" **Vet Research Communication** 38, 21-27

Ermiah E, Buhmeida A, Abdalla F, Khaled BR, Salem N, Pyrhonen S, Collsn Y (2012) "Prognostic value of proliferation markers: immunohistochemical Ki-67 expression and cytometric S-phase fraction of women with breast cancer in Libya" **Journal of Cancer** 3, 421-431

Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J (2005) "Caspase family proteases and apoptosis" **Acta Biochim Biophys Sin.** 37 (11), 719-727

Faustino A (1999) Studio morfopatologico ed immunoistochimico dei tumori mammary spontanei nei carnivore. Dottorato di ricerca in patologia comparata degli animal domestici e selvatici. Università Degli studi di Milano, Facolta di Medicina Veterinaria 134-149

Frankfurt OS, Robb JA, Sugarbaker EV (1997) "Apoptosis in breast carcinomas detected with monoclonal antibody to single-stranded DNA: relation to bcl-2 expression, hormone receptors and lymph node metastases" **Clin Cancer Res** 3, 465-471

Fisher DE (2001) "Pathways of apoptosis and the modulation of cell death in cancer" **Hematol Oncol Clin North Am** 15, 931-956

Gandhi A, Holland PA, Knox WF, CS Potten, Bundred NJ (1998) "Evidence of significant apoptosis in poorly differentiated ductal carcinoma in situ of the breast" **British Journal of Cancer** 78, 788-794

Geraldes M, Gartner F, Schmitt F (2000) "Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours" **Veterinary Record** 146, 403-406

Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H (1983) "Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a nuclear antigen associated with cell proliferation" **International Journal of Cancer** 31, 13-20

González-Cámpora R, Ruiz MRG, Ramirez FV, Martín JJR, Santos JMF, Martos MMR, Pascual AMP (2000) "Apoptosis in breast carcinoma" **Pathology Research and Practice** 196, 167-174

Green D, Kroemer G (1998) "The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria" **Trends Cell. Biol** 8, 267-271

Grutter GM (2000) "Caspases: key players in programmed cell death" **Curr Opin Struct Biol.** 10(6) 649-655

Hadjiloucas I, Gilmore AP, Bundred NJ, Streul CH (2001) "Assessment of apoptosis in human breast tissue using an antibody against the active form of caspase 3: relation to tumour histopathological characteristics" **British Journal of Cancer** 85, 1522-1526

- Hail JRN, Carter BZ, Konopleva M, Andreeff M (2006) Apoptosis effector mechanisms: A requiem performed in different keys. **Apoptosis** 11, 889–904
- Hall PA, Levison DA, Woods AL, W Yu C, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillett R, Dover R, Waseem NH, Lane DP (1990) “Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms” **Journal of Pathology** 162, 285-294
- Hanahan D, Weinberg RA (2000) “The Hallmarks of Cancer” **Cell** 100, 57–70
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) “Hallmarks of Cancer: The next generation” **Cell** 144
- Hellmén E, Bergstrom R, Holmberg L, Spangberg IB, Hansson K, Lindgren A (1993) “Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases” **Vet Pathol** 30, 20-27.
- Hengartner MO (2000) “The biochemistry of apoptosis” **Nature** 407, 685-687
- Igney FH, Krammer PH (2002) “Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis” **Nat. Rev. Cancer** 2, 277-288
- Jones TC, Hunt RD, King NW (1997) “Mammary Gland Veterinary Pathology” **Williams & Wilkins** 6, 1191-1201.
- Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV (1994) “Apoptosis. It’s significance in cancer and cancer therapy” **Cancer** 58 (2), 175-180
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) “Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics” **Br J Cancer** 26(4), 239-257
- Kroemer G (1997) “The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis” **Nat Med** 3(6), 614-620
- Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssière JL, Mignotte B (1995) “The biochemistry of programmed cell death” **Faseb J.** 9(13) 1277-1287
- Kroemer G, Galluzzi I, Brenner C (2007) “Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death.” **Physiol. Rev.** 87, 99–163
- Kumamoto H, Kimi K, Ooya K (2001) “Immunohistochemical analysis of apoptosis-related factors (Fas, Fas ligand, caspase-3 and single stranded DNA) in ameloblastomas” **J Oral Pathol Med** 30(10), 596-602
- Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y (2003) “Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages” **J. Immunol.** 171(9), 4672-4679
- Lana SE, Rutteman GR, Withrow SJ (2007) “Tumors of the mammary gland” **Small Animal Clinical Oncology** 4, 619-636
- Lee CH, Kweon OK (2002) “Mutation of p53 tumour suppressor gene in spontaneous canine mammary tumors” **J Vet Sci** 3, 321-325

Liao X, Tang S, Thrasher JB, Griebeling TL, Li B (2005) "Small-interfering RNA-induced androgen receptor silencing leads to apoptotic cell death in prostate cancer" **Mol. Cancer Ther** 4, 505-515

Loro LL, Vintermyr OK, Johannessen AC (2003) "Cell death regulation in oral squamous cell carcinoma: methodological considerations and clinical significance" **J Oral Pathol Med** 32, 125-138

Maciorowski Z, Klijanienko J, Padoy E, Mosseri V, Fourquet A, Chevillard S, Elnaggar AK, Vielh P (2001) "Comparative image and flow cytometric TUNEL analysis of fine needle samples of breast carcinoma" **Cytometry** 46, 150-156

Mack L, Kerkvliet N, Doig G, O'Malley FP (1997) "Relationship of a new histological categorization of ductal carcinoma in situ of the breast with size and the immunohistochemical expression of p53, c-erbB2, bcl-2 and Ki-67" **Human Pathology** 28, 974-979

Matos AJF, Baptista CS, Gartner MF, Rutteman GR (2012) "Prognostic studies of canine and feline mammary tumors: the need for standardized procedures" **The Veterinary Journal** 193, 24-31

Matos AJF, Lopes CCC, Faustino AMR, Carvalheira JGV, Santos MSA, Rutteman GR, Gartner MFRM (2006) "MIB-1 Labelling Indices According to Clinico-pathological Variables in Canine Mammary Tumours: A Multivariate Study" **Anticancer Research** 26, 1821-1826

Misdorp W (1991) "Progestagens and mammary tumours in dogs and cats" **Acta Endocr** (Copenhagen) 125, 27-31

Misdorp W (2002) "Tumors of the mammary gland" In D. J. Meuten (Ed.), **Tumors in domestic animals** 4, 575-606

Misdorp W, Else RW, Hellmén E, Lipscomb TP (1999) "Histological classification of mammary tumours of the dog and cat" **Armed Forces Institute of Pathology** 2, 11-56

Nakopoulou L, Alexandrou P, Stefanaki K, Panayotopoulou E, Lazaris AC, Davaris PS (2001) "Immunohistochemical expression of caspase-3 as an adverse indicator of the clinical outcome in human breast cancer" **Pathobiology** 69, 266-273

Nelson L, Kelly W (1974) "Changes in canine mammary gland histology during the estrous cycle" **Toxicology and Applied Pharmacology** 27, 113-122

O'Donovan N, Crown J, Stunell H, Hill AD, McDermott E, O'Higgins N, Duffy MJ (2003) "Caspase-3 in breast cancer" **Clin Cancer Res.** 9(2), 738-742

Parton M, Krajewski S, Smith I, Krajewska M, Archer C, Naito M, Ahern R, Reed J, Dowsett M (2002) "Coordinate expression of apoptosis-associated proteins in human breast cancer before and during chemotherapy" **Clinical Cancer Research** 8, 2100-2108

Pawlowski KM, Maciejewski H, Majchrzak K, Dolka I, Mol JA, Motyl T, Król M (2013) "Five markers useful for the distinction of canine mammary malignancy" **BMC Veterinary Research** 9:138

Peña LL, Nieto AI, Pérez-Alenza D, Cuesta P, Castaño M (1998) "Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables" **J Vet Diagn Invest** 10 (3), 237-246

Pérez Alenza MD, Pena L, del Castillo N, Nieto AI (2000) "Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours" **J Small Anim Pract.** 41, 287-291.

Pinho SS, Carvalho S, Cabral J, Reis CA, Gartner F (2012) "Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis" **Translational Research** 159, 165-172

Queiroga F, Lopes C (2002) "Canine mammary tumors- New perspectives" **Congresso de Ciências Veterinárias**, SPCV, Oeiras, 183-190

Rudland P (1991) "Histochemical organization and cellular composition of ductal buds in developing human breast: evidence of cytochemical intermediates between epithelial and myoepithelial cells" **Journal of Histochemistry and Cytochemistry** 39, 1471-1484

Russo J, Ao X, Grill C, Russo I (1999) "Pattern of distribution of cells positive for estrogen receptor α and progesterone receptor in relation to proliferating cells in the mammary gland" **Breast Cancer Research and Treatment** 53, 217-227

Rutteman GR, Kirpensteijn J (2003) "Tumours of the mammary glands *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology*" **British Small Animal Veterinary Association** 2, 234-242

Santos A, Lopes C, Marques RM, Amorim I, Ribeiro J, Frias C, Vicente C, Gartner F, Matos A (2011) "Immunohistochemical analysis of urokinase plasminogen activator and its prognostic value in canine mammary tumors" **The Veterinary Journal** 189, 43-48

Santos AA, Lopes CC, Ribeiro JR, Martins LR, Santos JC, Amorim IF, Gartner F, Matos AJ (2013) "Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumors: a multivariable survival study" **BMC Veterinary Research** 9:1

Santos M, Marcos R, Faustino AMR (2010) "Histological study of canine mammary gland during the oestrous cycle" **Reproduction in Domestic Animals** 45, 146-154

Sarli G, Preziosi R, Benazzi C, Castellani G, Marcato PS (2002) "Prognostic value of histologic stage and proliferative activity in canine malignant mammary tumors" **J Vet Diagn Invest.** 14, 25-34.

Schöndorf T, Göhring UJ, Becker M, Hoopmann M, Schmidt T, Rützel S, Rein DT, Ulrich U, Fichteler R, Bersch A, Mallmann P, Valter MM (2004) "High apoptotic index correlates to p21 and p27 expression indicating a favorable outcome of primary breast

cancer patients, but lacking prognostic significance in multivariate analysis" **Pathobiology** 71, 217-222

Sirvent JJ, Salvadó MT, Santafe M, Martínez S, Brunet J, Alvaro T, Palacios J (1995) "p53 in breast cancer Its relation to histological grade, lymph-node status, hormone receptors, cell-proliferation fraction (ki-67) and c-erbB-2 Immunohistochemical study of 153 cases" **Histology Histopathology** 10, 531-539

Soini Y, Paakko P, Lehto V-P (1998) "Histopathological Evaluation of Apoptosis in Cancer" **American Journal of Pathology** 153, 1041-1053

Sorenmo K (1998) "An update on canine mammary gland tumors" **Proceedings of the 16th Acvim Forum**, 387-388

Sorenmo K (2003) "Canine mammary gland tumors" **Vet Clin North Am Small Anim Pract.** 33, 573-96

Sorenmo KU, Shofer FS, Goldschmidt (2000) "Effect of Spaying and Timing of Spaying on Survival of Dogs With Mammary Carcinoma" **Journal of Veterinary Internal Medicine** 266-270

Strasser A, O'Connor L, Dixit VM (2000) "Apoptosis signaling" **Annu Rev Biochem** 69, 217-245

Terzian ACB, Zuccari DAPC, Pereira RS, Pavam MV, Ruiz CM, Sueiro FAR, Coelho J (2007) "Avaliação da caspase-3 e Ki-67 como marcadores prognósticos nas neoplasias mamárias em cadelas" **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** 44, 96-102

Thompson CB (1995) "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease" **Science** 267,1456-1462

Tobón-Arroyave SI, Villegas-Acosta FA, Ruiz –Restrepo SM, Vieco-Durán B, Restrepo-Misas M, Londoño-López ML (2004) "Expression of caspase-3 and structural changes associated with apoptotic cell death of keratinocytes in oral lichen planus" **Oral Dis.** 10 (3) 173-178

Tumuluri V, Thomas GA, Fraser IS (2002) "Analysis of the Ki-67 antigen at the invasive tumor front of human oral squamous cell carcinoma" **J Oral Pathol Med** 31, 598-604

Vakkala M, Paakko P, Soini Y (1999) "Expression of caspase-3, 6 and 8 is increased in parallel with apoptosis and histological aggressiveness of the breast lesion" **British Journal of Cancer** 81, 592-599

Walker JA, Jones JL, Chappell S, Walsh T, Shawn JA (1997) "Molecular pathology of breast cancer and it's application to clinical management" **Cancer metastasis reviews** 16, 5-27

Weidner N, Moore DH 2nd, Vartanian R (1994) "Correlation of Ki-67 antigen expression with mitotic figure index and tumor grade in breast carcinomas using the novel "paraffin"-reactive MIB1 antibody" **Human. Pathol.** 25, 337-342

Xiao LJ, Zhao S, Zhao EH, Zheng X, Gou WF, Takano Y, Zheng HC (2013) ""Clinicopathological and prognostic significance of Ki-67, caspase-3 and p53 expression in gastric carcinomas" **Oncology Letters** 6, 1277-1284