

MARIA JOÃO CARDOSO SERRAS

**COMPARAÇÃO DO ÍNDICE DE KI-67 OBTIDO
ATRAVÉS DE CONTAGEM MANUAL E DE
ANÁLISE AUTOMATIZADA (IMMUNORATIO)
EM AMOSTRAS DE TUMORES MAMÁRIOS
CANINOS, CARCINOMAS MAMÁRIOS FELINOS
E MASTOCITOMAS**

Orientador: Professor Doutor Pedro Faísca

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Faculdade de Medicina Veterinária**

Lisboa

2019

MARIA JOÃO CARDOSO SERRAS

**COMPARAÇÃO DO ÍNDICE DE KI-67 OBTIDO
ATRAVÉS DE CONTAGEM MANUAL E DE
ANÁLISE AUTOMATIZADA (IMMUNORATIO)
EM AMOSTRAS DE TUMORES MAMÁRIOS
CANINOS, CARCINOMAS MAMÁRIOS FELINOS
E MASTOCITOMAS**

Dissertação defendida em provas públicas para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias no dia 21 de Maio de 2019, com o despacho Reitoral n.º 130/2019, com a seguinte composição de júri:

Presidente: Prof.^a Doutora Laurentina Pedroso
Arguente: Prof.^a Doutora Maria dos Anjos Pires
Orientador: Prof. Doutor Pedro Faísca

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2019

*The science of today is the technology
of tomorrow.*

Edward Teller

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao meu orientador, o Professor Doutor Pedro Faisca, por todos os conhecimentos transmitidos ao longo do curso, pela forma como motivou o meu interesse pela área da patologia animal e da histopatologia e pela sua disponibilidade e ajuda prestada durante a realização da tese. Gostaria ainda de agradecer o facto de ter acreditado em mim e me ter dado a oportunidade de estagiar na Unidade de Histopatologia do Instituto Gulbenkian das Ciências (IGC).

O meu agradecimento à Joana Rodrigues e à Marta Pinto da Unidade de Histopatologia do IGC e à Ana Vinagre e à Sara Bonnucci da Unidade de Microscopia Electrónica do IGC pela simpatia, disponibilidade, motivação e conhecimento que me transmitiram ao longo do estágio realizado no IGC.

À Doutora Inês Carvalho e à Doutora Maria João Soares um profundo agradecimento pela cedência das amostras para a realização deste trabalho.

Um agradecimento especial ao Professor Dr. João Ribeiro pela forma como fez crescer a minha curiosidade pela área da Neurologia, por me ter mostrado, durante o estágio realizado na Referência Veterinária, o excelente ser humano que é em todas as decisões que toma no seu dia-a-dia e por me ter proporcionado um estágio cheio de conhecimento, inspiração, boa disposição e acima de tudo que me fez crescer tanto a nível profissional como pessoal. Um profundo agradecimento à Dra. Cristina Ribeiro pelo conhecimento, paciência e dedicação, à Elsa pela forma como me acolheu e me apoiou desde o primeiro dia e à Enfermeira Joana pela cumplicidade, partilha e amizade.

Um sincero agradecimento à Professora Doutora Raquel Matos pelo seu contributo essencial na realização do tratamento estatístico, sem o qual a realização da dissertação não teria sido possível.

Aos meus primos Manel e Zé Artur, por ouvirem os meus desabafos e me ajudarem a solucionar os contratemplos.

A todos os meus verdadeiros amigos, Su, Musta, Mariana, Didi, Susana, Fitas, Adriano e Ana Maria por terem estado sempre presentes ao longo desta jornada.

À Inês e à Xica pela infância maravilhosa que me proporcionaram ao terem partilhado comigo tantas histórias de amor com animais e que, sem dúvida, acabaram por afetar a minha escolha profissional.

Às minhas grandes amigas e colegas de faculdade, Rita, Patrícia, Mafalda e Bea por todos os momentos inesquecíveis que partilhámos ao longo do curso, pela sinceridade, cumplicidade e amizade.

Um grande agradecimento à Rita e à Su por me ajudarem a ultrapassar todos os obstáculos e por terem sempre acreditado em mim.

A todos os docentes da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias que me acompanharam ao longo do meu percurso académico, pelo apoio, dedicação, qualidade de ensino e por me terem feito crescer tanto a nível pessoal como profissional.

Por fim, agradeço à minha família, pelo apoio, incentivo e dedicação ao longo deste percurso e de toda a minha vida. À minha mãe por me ter apoiado sempre de forma incondicional, ao meu pai por ter aceite a minha decisão, à Amélia por ter contribuído para a minha determinação e genuinidade, e aos meus avós por terem feito parte do meu percurso sem nunca duvidarem das minhas capacidades.

Resumo

O Ki-67 trata-se de uma proteína nuclear expressa em todas as fases do ciclo celular, excepto na fase de repouso, utilizada como marcador de prognóstico em vários tumores.

A contagem manual é um método amplamente utilizado para avaliar o índice de Ki-67, no entanto é moroso e pouco prático. Com este estudo, pretendeu-se comparar a contagem manual com a análise automatizada (ImmunoRatio) no cálculo do índice de Ki-67, definir a melhor metodologia para a análise de amostras através do *plug-in* ImmunoRatio e ainda verificar a capacidade do ImmunoRatio na análise de imagens de menor ampliação (50x).

Foram analisadas um total de 18 amostras (2 mastocitomas, 11 carcinomas mamários felinos e 5 tumores mamários caninos). Em amostras homogéneas foram seleccionados cinco campos aleatórios e, em amostras heterogéneas, três campos aleatórios e três campos com um elevado número de células Ki-67-positivas (*hotspots*).

Verificou-se uma correlação forte, positiva e estatisticamente significativa e uma concordância quase perfeita entre a contagem manual e as diferentes análises realizadas no *plug-in* ImmunoRatio (ImmunoRatio 200x sem estroma, ImmunoRatio 400x sem estroma e ImmunoRatio 200x com estroma). O estudo sugere ainda que a utilização do *plug-in* em imagens de menor ampliação (50x) permite obter resultados idênticos à média das contagens manuais da mesma amostra.

Pode assim concluir-se que a utilização do ImmunoRatio pode ser uma alternativa viável e rápida à contagem manual. No entanto, sugere-se que nos casos em que se obtenham valores próximos dos valores limite indicativos de agressividade, se reconfirme com a contagem manual.

Palavras-chave: Carcinomas Mamários Felinos, ImmunoRatio, Imunohistoquímica, Ki-67, Mastocitomas, Tumores Mamários Caninos

Abstract

Ki-67 is a nuclear protein expressed in every phase of the cell cycle, except in the resting phase, which is used as a prognostic marker for various types of tumours.

Manual counting is a widely used method to evaluate the Ki-67 index, even though it is a time-consuming and laborious. In this study, the objectives were to compare the method of manual counting with automated analysis (ImmunoRatio) when determining the Ki-67 index, to define the best methodology for sample analysis through the ImmunoRatio plug-in, and verify its capacity to analyse lower magnification images (50x).

A total of 18 samples were analysed (2 mast cell tumours, 11 feline mammary carcinomas and 5 canine mammary tumours). In homogeneous samples, five random fields were chosen and, in heterogeneous samples, three random fields and three fields with a high number of Ki-67 positive cells (hotspots) were selected.

A strong correlation, positive and statistically significant, and an almost perfect concordance between the manual count and the different analyses performed with the ImmunoRatio plug-in (ImmunoRatio 200x without stroma, ImmunoRatio 400x with stroma and ImmunoRatio 200x with stroma) were verified. This study also suggests that using the plug-in with lower magnification images (50x) allows for identical results to the manual count average for the same sample.

It can thus be concluded that the use of ImmunoRatio can be a viable and faster alternative to manual counting. Nevertheless, it is suggested that, in the cases where approximate values to the aggressiveness indicative limit are obtained, manual counting should be used to confirm these values.

Keywords: Canine Mammary Tumours, Feline Mammary Carcinomas, Immunohistochemistry, ImmunoRatio, Ki-67, Mast Cell Tumours

Lista de Abreviaturas e Símbolos

AgNOR – Regiões Organizadoras Nucleolares Argirofílicas

CANR – Registo de Neoplasia Animal da Califórnia

CM – Contagem Mitótica

CMFs – Carcinomas Mamários Felinos

DAB – Diaminobenzidina

Estroma ImR 200x – ImmunoRatio em imagens com uma ampliação de 200x com estroma

H&E – Hematoxilina e eosina

HPF – *High power fields*

IAM – Índice de Atividade Mitótica

IC – Intervalo de Confiança

ICC – Coeficiente de Correlação Intraclasse

IGC – Instituto Gulbenkian de Ciência

IHQ – Imunohistoquímica

IM – Índice Mitótico

ImR 200x – ImmunoRatio em imagens com uma ampliação de 200x sem estroma

ImR 400x – ImmunoRatio em imagens com uma ampliação de 400x sem estroma

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

MCT – Mastocitoma

MCTs – Mastocitomas

NIH – *National Institutes of Health*

OL – Oil Red

PAS - Periodic Acid-Schiff

PCNA – Antígeno Nuclear de Proliferação Celular

RE – Recetores de Estrogénio

RM – Ressonância Magnética

r_s – Rho de Spearman

TM – Tricrómio de Masson

TMCs – Tumores Mamários Caninos

TMFs – Tumores Mamários Felinos

UH – Unidade de Histopatologia

Índice Geral

RESUMO.....	5
ABSTRACT	6
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	7
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	10
ÍNDICE DE TABELAS	11
ÍNDICE DE FIGURAS	13
RELATÓRIO DE ESTÁGIO	14
I. INTRODUÇÃO	18
1.1. ImageJ e Fiji	18
1.2. ImmunoRatio	19
1.3. Biomarcadores de prognóstico	20
1.3.1. Ciclo celular	21
1.3.2. Ki-67.....	22
1.3.3. PCNA	23
1.3.4. AgNOR.....	24
1.3.5. Contagem mitótica	25
1.4. Tumor Mamário Canino	26
1.5. Carcinoma Mamário Felino.....	29
1.6. Mastocitoma	32
1.7. Objetivo	35
II. MATERIAIS E MÉTODOS	37
2.1. Seleção e Caracterização da Amostra	37
2.2. Contagem Manual	38
2.3. Análise Automatizada – ImmunoRatio	39
2.4. Análise Estatística	40
III. RESULTADOS	42
3.1. Média e Desvio padrão.....	42
3.2. Correlação entre as várias metodologias – Coeficiente de correlação de Spearman	42
3.3. Concordância entre as várias metodologias – ICC.....	46
3.4. Concordância entre as várias contagens manuais de amostras homogêneas e heterogêneas – ICC.....	49

3.5. Concordância entre a média das contagens manuais 200x e o método ImR 50x – ICC	50
IV. DISCUSSÃO	52
V. CONCLUSÃO	61
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

Índice de Gráficos

Gráfico 1 - Elevada correlação entre o índice de Ki-67 obtido pelo método Manual 200x e o índice de Ki-67 obtido pelas outras metodologias (ImR 200x, ImR 400x).....	43
Gráfico 2 - Excelente correlação entre o índice de Ki-67 obtido no método Manual 200x e no ImR 200x.....	43
Gráfico 3 - Elevada correlação entre o índice de Ki-67 obtido no método Manual 200x e no ImR 400x.....	43
Gráfico 4 - Elevada correlação entre o índice de Ki-67 obtido pelo Estroma ImR 200x e as metodologias sem estroma (ImR 200x e Manual 200x)	45
Gráfico 5 - Elevada correlação entre o índice de Ki-67 obtido no método ImR 200x e no Estroma ImR 200x.....	45
Gráfico 6 - Elevada correlação entre o índice de Ki-67 obtido no método Manual 200x e no Estroma ImR 200x.....	45

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Coeficientes de correlação do método Manual 200x com as metodologias ImR 200x e ImR 400x.....	42
Tabela 2 - Coeficientes de correlação do método Manual 200x com as metodologias ImR 200x e ImR 400x estratificados pelo tipo de tumor (Tumor mamário canino, Carcinoma mamário felino e Mastocitoma).....	44
Tabela 3 - Coeficientes de correlação do método Estroma ImR 200x com as metodologias ImR 200x e Manual 200x.....	44
Tabela 4 - Coeficientes de correlação do método Estroma ImR 200x com as metodologias ImR 200x e Manual 200x estratificados pelo tipo de tumor (Tumor mamário canino, Carcinoma mamário felino e Mastocitoma).....	46
Tabela 5 - Concordância entre o método Manual 200x e as metodologias ImR 200x e ImR 400x.....	46
Tabela 6 - Concordância entre o método Manual 200x e as metodologias ImR 200x e ImR 400x estratificada pelo tipo de tumor (Tumor mamário canino, Carcinoma mamário felino e Mastocitoma).....	47
Tabela 7 - Concordância entre o método Estroma ImR 200x e as metodologias ImR 200x e Manual 200x.....	47
Tabela 8 - Concordância entre o método Estroma ImR 200x e as metodologias ImR 200x e Manual 200x estratificada pelo tipo de tumor (Tumor mamário canino, Carcinoma mamário felino e Mastocitoma).....	48
Tabela 9 - Concordância entre as diferentes contagens manuais de amostras homogêneas.....	49
Tabela 10 - Concordância entre as diferentes contagens manuais de amostras homogêneas estratificada pelo tipo de tumor.....	49
Tabela 11 - Concordância entre as diferentes contagens manuais de amostras heterogêneas.....	49
Tabela 12 - Concordância entre as diferentes contagens manuais de amostras heterogêneas estratificada pelo tipo de tumor.....	50
Tabela 13 - Concordância entre a média das várias contagens manuais a 200x e o método ImR 50x.....	50

Tabela 14 - Concordância entre a média das várias contagens manuais a 200x e o método ImR 50x estratificada pelo tipo de tumor (Tumor mamário canino, Carcinoma mamário felino e Mastocitoma)51

Índice de Figuras

Figura 1 – Esquema representativo do ciclo celular.....	22
Figura 2 - Mastocitoma 200x - Contagem manual com o auxílio do <i>plug-in cell counter</i> no <i>software</i> ImageJ. 1 – células negativas para Ki-67; 2 - células positivas para Ki-67.....	38
Figura 3 - Carcinoma mamário felino 400x – Exemplo da função Polygon Selection Tool do ImageJ-Fiji para eliminação do estroma.....	39
Figura 4 - Mastocitoma 200x - Análise automatizada através do ImmunoRatio. Células a azul – células negativas para Ki-67; células a laranja - células positivas para Ki-67.....	40
Figura 5 - Mastocitoma 400x - Análise automatizada através do ImmunoRatio. Células a azul – células negativas para Ki-67; células a laranja - células positivas para Ki-67.....	40

RELATÓRIO DE ESTÁGIO

No âmbito do plano de estudos do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária ministrado na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, foi realizada a primeira parte do estágio curricular na Referência Veterinária na área da neurologia clínica, imagiológica e cirúrgica e a segunda parte no Instituto Gulbenkian das Ciências (IGC) na área da histopatologia, totalizando seis meses de aprendizagem.

Referência Veterinária

O estágio curricular realizado na área da neurologia clínica, imagiológica e cirúrgica teve lugar na Referência Veterinária sob orientação do Dr. João Ribeiro no período de 1 de Outubro de 2017 a 31 de Dezembro de 2017 com uma duração total de três meses. A Referência Veterinária situa-se no Condomínio Empresarial de Alcoitão, na Estrada de Manique 1610 em Alcabideche, e tem como objetivo disponibilizar uma estrutura com capacidade de auxiliar as necessidades enfrentadas pela clínica geral de animais de companhia, de maneira a complementar a sua atividade, funcionando exclusivamente por referência ou em segunda opinião.

Ao longo do estágio foi possível o desenvolvimento de diversas atividades, tais como:

- assistência e colaboração nas consultas de neurologia;
- aprendizagem e execução sistemática do exame neurológico;
- participação nas atividades de internamento, tais como higienização dos pacientes, colocação de cateteres, colheita de sangue e administração de medicação IV, IM e oral;
- realização de radiografias;
- apoio na execução de ressonâncias magnéticas (RM) e sua interpretação;
- assistência e colaboração na recolha de líquido-cefalorraquidiano (LCR) da cisterna magna e lombar;

- participação como circulante e como ajudante de cirurgião em cirurgias de hérnias discais cervicais, torácicas e lombares, divertículos aracnóides, tumores extramedulares intradurais e extradurais e tumores cerebrais;
- preparação pré-cirúrgica do paciente, nomeadamente, colocação de cateter endovenoso, entubação, preparação do campo cirúrgico, monitorização e recuperação anestésica;
- observação microscópica e análise do LCR;
- processamento de análises laboratoriais (bioquímicas e hemograma);
- realização de necrópsias.

O presente estágio permitiu assim, a discussão e acompanhamento de casos clínicos, a discussão de diagnósticos diferenciais, a realização de técnicas imagiológicas avançadas e a elaboração de planos de tratamento adequados a cada situação. Todas as atividades desenvolvidas permitiram integrar e consolidar os conhecimentos adquiridos ao longo do percurso académico e desenvolver capacidades práticas e de raciocínio de diagnóstico, bem como a compreensão da sua importância no contexto real da profissão.

Instituto Gulbenkian das Ciências (IGC)

O estágio curricular realizado na área da Histopatologia teve lugar no IGC sob orientação do Dr. Pedro Faisca no período de 1 de Janeiro de 2018 a 31 de Março de 2018 com uma duração total de três meses. O Instituto Gulbenkian das Ciências situa-se na Rua da Quinta Grande, número 6 em Oeiras e tem como objetivo permitir e auxiliar a investigação em Portugal.

A Unidade de Histopatologia (UH) do IGC está disponível para todos os grupos internos do IGC, mas também para laboratórios associados, instituições académicas e empresas privadas. A UH tem disponíveis vários serviços, nomeadamente, processamento e inclusão em parafina, microtomia, criotomia, vibrotomia, coloração hematoxilina e eosina (H&E) , técnicas histoquímicas (Gram, Giemsa, Ziehl-Neelsen, Periodic Acid-Schiff (PAS), Luxol Fast Blue com contraste de Nissl ou PAS, Tricrómio de Masson (TM), Nissl, Perls, Luna e outros) e aquisição de imagens de alta qualidade através de um digitalizador de

lâminas (HAMAMATSU NanoZoomer-SQ Digital slide scanner C13140-01). A Unidade permite a formação em preparação de amostras, vibrotomia e criotomia para novos utilizadores e dispõe ainda de consultoria em histologia, patologia comparada e apoio no delineamento experimental e na preparação de manuscritos.

Durante o período de estágio foi-me possível trabalhar com amostras histológicas provenientes de diferentes modelos: murganho (*Mus musculus*) e mosca (*Drosophila melanogaster*). No caso do murganho, observei e analisei amostras histológicas de diferentes sistemas, nomeadamente, sistema tegumentar (pele), sistema muscular (músculo), sistema circulatório (coração), sistema linfático (baço, linfonodos, medula óssea), sistema respiratório (pulmões, brônquios, bronquíolos), sistema gastrointestinal e órgãos anexos (glândulas salivares, estômago, fígado, pâncreas, intestino delgado, intestino grosso e apêndice), sistema urinário (rins), sistema nervoso central (cérebro) e tecido adiposo. No caso da mosca, apesar de todos os sistemas estarem presentes numa única lâmina, a análise debruçou-se principalmente sobre o sistema nervoso central (cérebro).

As atividades desenvolvidas ao longo do estágio variaram consoante as experiências que estavam a decorrer nos diferentes grupos do IGC. Grande parte das atividades passavam inicialmente pela digitalização das lâminas no digitalizador de lâminas HAMAMATSU NanoZoomer-SQ Digital slide scanner C13140-01e posterior utilização do *software* ImageJ (ex: criação e execução de macros - macro para seleção e medição da área de adipócitos; estudos morfométricos em tecido adiposo – área dos adipócitos; estudos morfométricos no coração - área de fibrose e área dos cardiomiócitos). Outra parte das atividades concentrava-se na classificação e descrição morfológica de lesões através da utilização do microscópio LEICA DMLB2 que se encontrava ligado a um computador MAC OS X Version 10.5.8 2.4ghz.

O presente estágio permitiu-me assim, adquirir valências em diversas funcionalidades do *software* ImageJ, adquirir e consolidar conhecimentos de interpretação e análise de amostras histológicas de modelos animais e apesar da maioria das lâminas analisadas apresentarem coloração H&E, tive ainda a possibilidade de visualizar lâminas coradas com PAS, TM e oil red (OR). Assim sendo, ao longo dos três meses de estágio no

IGC, vários foram os conhecimentos obtidos na área da histopatologia, a qual é um valioso instrumento para a investigação científica.

I. INTRODUÇÃO

Atualmente, a maioria da informação biomédica é adquirida através de imagens (Schindelin *et al.*, 2012). Os avanços na tecnologia em microscopia têm permitido a obtenção cada vez mais rápida, acessível e precisa de imagens biomédicas quantitativas, o que exige técnicas de processamento e de análise de imagens mais avançadas (Schindelin *et al.*, 2015). Assim sendo, os investigadores cada vez mais necessitam, a nível informático, da ajuda de programadores para solucionar determinados problemas, acabando os programadores por ter um grande impacto na investigação científica atual (Schindelin *et al.*, 2012).

1.1. ImageJ e Fiji

Desde que os equipamentos de imagem digital entraram no mundo da ciência, o objetivo tem sido usar processos computacionais para acelerar tarefas repetitivas de modo a obter resultados quantitativos, os quais são mais fidedignos do que as observações qualitativas.

O *software* NIH ImageJ, antecessor do atual *software* ImageJ, foi desenvolvido por Wayne Rasband no *National Institutes of Health* (NIH) em 1987 (Schneider *et al.*, 2012; Schindelin *et al.*, 2015). O imageJ é um *software* Java gratuito, simples e de fácil acesso, sendo que a sua funcionalidade pode ser alterada consoante as necessidades do usuário (Schindelin *et al.*, 2015). O imageJ pode ser utilizado numa plataforma online ou através do download do programa em qualquer computador com o Java 1.5 ou posterior (Ferreira, & Rasband, 2012). O download do ImageJ está disponível para Windows, Mac OS X e Linux (Ferreira, & Rasband, 2012). Uma das principais características do ImageJ é a sua capacidade de suportar uma grande variedade de formatos de imagem (Collins, 2007), nomeadamente, TIFF, GIF, JPEG, BMP, DICOM, FITS em 8 bits, 16 bits e 32 bits (Ferreira, & Rasband, 2012).

O ImageJ não é apenas um *software* de análise morfométrica, sendo suficientemente flexível para ser adaptado aos inúmeros requisitos exigidos pelos laboratórios. Alguns exemplos das funcionalidades do *software* incluem a medição de áreas em tecidos corados seletivamente, a contagem de células, a medição da área de uma célula individual e a quantificação imunohistoquímica (IHQ) de antigénios, entre outros (Papadopoulos *et al.*, 2007).

A adição de macros (listas de instruções simples que descrevem as ações executadas por um usuário e que o ImageJ interpreta e repete) e *plugins* ao programa, permite acrescentar diferentes conceitos de análise de imagem (Schindelin *et al.*, 2015).

Desde o início que o ImageJ tem disponíveis vários *plugins*, sendo que o seu número aumentou rapidamente, existindo mais de 500 *plugins* no site do ImageJ que disponibilizam uma ampla gama de funções. Os *plugins* podem ser combinados para realizar análises complexas e os usuários podem selecionar entre os vários *plugins* que oferecem funcionalidades semelhantes, a ferramenta que mais se adequa ao que pretendem. A longa lista de *plugins* reflete o uso do ImageJ em vários campos da ciência e da engenharia, tais como a medicina, a microscopia e a ciência dos materiais (Collins, 2007).

As macros apresentam um formato de programação básico, permitindo aos usuários em geral, sem experiência em programação, criar a sua própria macro. É possível ao usuário gravar a macro que desenvolveu, permitindo a sua partilha, futura utilização e modificação conforme necessário (Schneider *et al.*, 2012). De acordo com Schneider *et al.*, (2012) existem aproximadamente 325 macros disponíveis no site do ImageJ.

O *software* Fiji, utilizado no presente estudo, trata-se de uma variante do ImageJ, sendo que a principal diferença é o facto de apresentar os *plugins* do ImageJ já instalados, suplementando-o com funcionalidades adicionais (Schindelin *et al.*, 2012). Este *software* foi desenvolvido com o intuito de facilitar a análise de imagens biomédicas e permite a transformação de novos algoritmos em *plugins* do ImageJ que posteriormente podem ser partilhados, através de um sistema de actualização integrado, com outros utilizadores (Schindelin *et al.*, 2012). A redundância e o grande número de *plugins* disponíveis para o ImageJ dificultam a identificação de soluções para determinados problemas, sendo que o *software* Fiji contorna esta desvantagem, uma vez que oferece uma seleção de *plugins* organizados por categorias (Schindelin *et al.*, 2012). Schindelin *et al.* (2012) propõem este *software* como uma plataforma que promove a colaboração produtiva entre ciência computacional e as comunidades científicas de investigação.

1.2. ImmunoRatio

O ImmunoRatio trata-se de uma aplicação gratuita que permite a análise automática de imagens histológicas imunocoradas de recetores de estrogénio, recetores de progesterona e

Ki-67 (Tuominen *et al.*, 2010). Este programa foi desenvolvido pela Universidade de Tampere, Finlândia e a sua aplicação encontra-se descrita no artigo “*ImmunoRatio: a publicly available web application for quantitative image analysis of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and Ki-67*” publicado na revista Breast Cancer Research em 2010, sendo que a sua utilização já foi validada num número significativo de estudos (Ferguson, 2013). O ImmunoRatio foi desenvolvido como um *plug-in* para o *software* de análise de imagem ImageJ e é utilizado como um auxiliar de diagnóstico dirigido a técnicos treinados para avaliar amostras imunocoradas, uma vez que os resultados obtidos devem ser sempre interpretados em conjunto com as imagens das lâminas originais. O ImmunoRatio suporta qualquer modelo de câmara de microscópio e vários formatos de imagem, tais como JPEG, JPEG2000, TIFF, BMP e PNG. Esta aplicação segmenta os núcleos diaminobenzidina (DAB) e hematoxilina da imagem que se pretende analisar, cria uma imagem na qual estes componentes se encontram corados de diferentes cores e calcula a percentagem de área nuclear DAB sobre a área nuclear total (Tuominen *et al.*, 2010).

Este *software* apresenta dois modos de utilização, o básico e o avançado. O modo básico consiste na seleção de uma imagem e respetiva análise online, sendo que o utilizador apenas intervém na seleção do tamanho médio dos núcleos. No modo avançado é possível a intervenção do utilizador em diversas funcionalidades, tais como, a utilização de uma imagem em branco para correção do *blankfield* de modo a melhorar irregularidades na luminosidade e no equilíbrio de cores, a especificação manual da escala da imagem original, o ajuste do limiar de hematoxilina (componente azul) e DAB (componente castanho), a análise apenas de uma região de interesse definida a partir da imagem, a utilização da equação de correção de resultados para calibrar a análise e a visualização de uma tabela de resultados (Tuominen *et al.*, 2010).

1.3. Biomarcadores de prognóstico

A proliferação celular trata-se de um processo biológico essencial a todos os organismos vivos tendo em conta o seu papel no crescimento e na manutenção da homeostase dos tecidos (Van Diest *et al.*, 1998). O controlo deste processo é fundamental, no entanto este encontra-se completamente desregulado em várias neoplasias (Bishop, 1987; Tumuluri *et al.*, 2002), sendo que a avaliação da atividade proliferativa das células tumorais se tornou uma

ferramenta essencial aos histopatologistas de modo a fornecer informação útil ao diagnóstico, comportamento clínico e terapia (Bologna-Molina *et al.*, 2013).

O ciclo celular consiste numa série de fases durante as quais ocorrem vários fenómenos que permitem a divisão celular, sendo que os genes reguladores celulares modulam o ciclo celular através de um grupo de proteínas (Scully *et al.*, 2000). Os marcadores proliferativos tratam-se de proteínas específicas ou outros fatores, cuja presença nas células indica que as mesmas se encontram em crescimento e em divisão celular (Bologna-Molina *et al.*, 2013).

Hoje em dia o método mais comum para determinar a atividade proliferativa são as técnicas de IHQ, cuja utilização se tem tornado cada vez mais rotineira por parte dos patologistas (Bologna-Molina *et al.*, 2013).

Na área da Medicina Veterinária têm sido desenvolvidos vários estudos na tentativa de desenvolver métodos menos subjetivos para a previsão do comportamento e prognóstico de vários tumores. Os quatro marcadores de proliferação mais comumente reportados em Medicina Veterinária são o Ki-67, as Regiões Organizadoras Nucleolares Argirofílicas (AgNOR), o Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) e índice mitótico (Abadie *et al.*, 1999; Scase *et al.*, 2006, Seguin *et al.*, 2006; Romansik *et al.*, 2007). O Ki-67 identifica as células que se encontram ativamente em ciclo celular, o AgNOR identifica o tempo de progressão do ciclo celular e o PCNA e o índice mitótico identificam as células em fases específicas do ciclo celular, fase S e fase M, respetivamente (Van Diest *et al.*, 1998).

1.3.1. Ciclo celular

O ciclo celular (Figura 1) consiste na alternância entre a interfase (G1, S, G2) e a mitose (M), sendo que a interfase é a fase mais longa. As células não proliferativas encontram-se geralmente interrompidas entre as fases M e S (síntese de DNA) e são referidas como células em repouso (G0). A maioria das células em tecidos normais encontram-se em G0. As células são estimuladas a iniciar o ciclo celular em resposta a fatores externos, incluindo fatores de crescimento e de adesão celular (Argyle, & Khanna, 2013). Durante a Fase S ocorre a duplicação dos cromossomas enquanto que a maioria dos outros componentes celulares são duplicados continuamente durante todo o ciclo. Durante a fase M os cromossomas replicados são segregados em núcleos individuais e a célula divide-se em dois

(citoquinese). A fase S e a Fase M estão separadas pelas fases G1 e G2, nas quais vários sinais intracelulares e extracelulares regulam a progressão do ciclo celular (Alberts *et al.*, 2008).

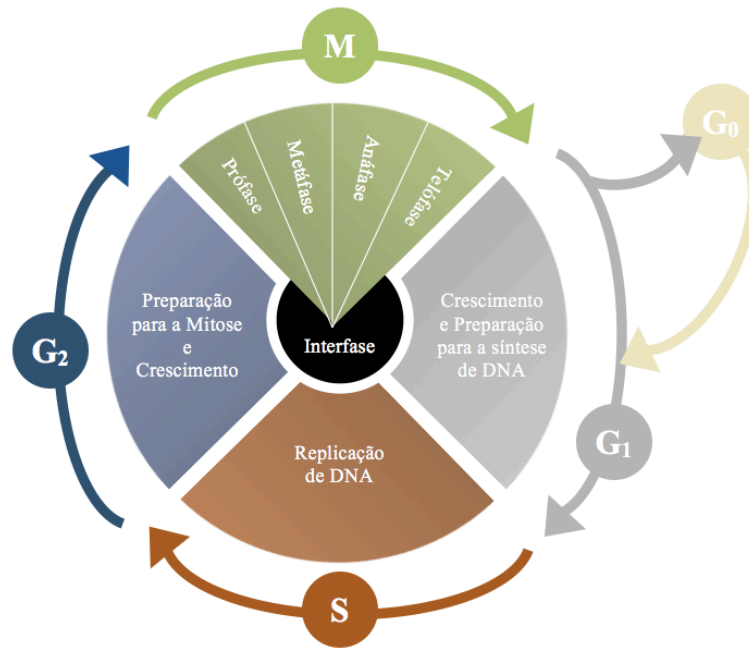


Figura 1 – Esquema representativo do ciclo celular.

1.3.2. Ki-67

O Ki-67 trata-se de uma proteína nuclear não-histónica com semi-vida inferior a uma hora, a qual é expressa em todas as fases do ciclo celular, exceto na fase de repouso (G0) (Gerdes *et al.*, 1984; Bruno, & Darzynkiewicz, 1992; Beresford *et al.*, 2006; Klopffleisch *et al.*, 2011). Esta proteína apresenta localização nuclear e os seus níveis de expressão são baixos durante a fase G1 e S, posteriormente aumentam durante a fase G2 e atingem o seu pico na fase M (mitose). Este padrão de expressão torna o antígeno Ki-67 um marcador de proliferação útil e fiável no prognóstico do cancro da mama da mulher (Yerushalmi *et al.*, 2010; Dowsett *et al.*, 2011).

O antígeno Ki-67 foi inicialmente detetado pelo anticorpo monoclonal Ki-67, cujo nome deriva da cidade de origem (Kiel) e do número do clone original que se encontrava no

poço número 67 de uma placa com 96 poços (Gerdes *et al.*, 1983). O anticorpo monoclonal Ki-67 foi descrito pela primeira vez em 1983 por Johannes Gerdes e colegas que o sugeriram como possível marcador de proliferação celular (Gerdes *et al.*, 1983). O anticorpo monoclonal standard para a detecção do Ki-67 é o MIB-1. A fração de células tumorais MIB-1-positivas está frequentemente correlacionada com o curso clínico da neoplasia (Ihmann *et al.*, 2004).

Em Medicina Veterinária está descrita a utilização desta proteína como marcador de prognóstico em vários tumores, nomeadamente, mastocitomas, carcinomas mamários felinos, carcinomas mamários caninos, melanomas e linfomas, uma vez que é possível avaliar o índice de proliferação tumoral através do número de células positivas para Ki-67 na IHQ (Mukaratirwa, 2005). Várias investigações concluíram que o índice de Ki-67 apresenta valor prognóstico em tumores mamários caninos, sendo que um elevado índice se encontra positivamente correlacionado com um elevado risco de metástases e um menor tempo livre de doença e sobrevida (Peña *et al.*, 1998; Nieto *et al.*, 2000; Sarli *et al.*, 2002; Zuccari *et al.*, 2004). Alguns estudos mais antigos, tanto em Medicina Humana como Veterinária, reportam um baixo valor prognóstico do Ki-67 em tumores mamários (Rudas *et al.*, 1994; Keshgegian & Cnaan, 1995; Lohr *et al.*, 1997). Estas diferenças podem estar relacionadas com o método e critério de amostragem e heterogenicidade associada à prevalência e comportamento biológico de diferentes tipos histológicos de tumores.

1.3.3. PCNA

O PCNA trata-se de uma proteína nuclear não histónica que funciona como co-factor da DNA polimerase delta e que está associado a fenómenos de reparação e replicação de DNA (McMormick & Hall, 1992; Oyama *et al.*, 1995; Sanchez & Elledge, 1995). A sua expressão ocorre em todas as fases do ciclo celular, no entanto os seus níveis de expressão variam consoante a fase do ciclo celular. Após a fase G1 a sua expressão aumenta, atingindo o seu pico máximo na fase S e diminuindo após a fase G2. Durante a fase M e em células não cíclicas (G0) a sua expressão diminui (McMormick & Hall, 1992; Tsuji *et al.*, 1992; Huang *et al.*, 1994; Sanchez & Elledge, 1995; Martinez-Lara *et al.*, 1996). O PCNA pode ser detetado em todas as fases do ciclo celular e em células não cíclicas, dado que a sua semi-vida varia entre 8 a 20 horas (Moldovan *et al.*, 2007). Quando as células se encontram em proliferação celular permanecem mais tempo na fase G1/S, o que permite a utilização do PCNA como

marcador de proliferação celular, uma vez que a sua expressão aumenta após a fase G1, atingindo o pico máximo na fase S. A taxa de síntese do PCNA está diretamente correlacionada com a taxa de proliferação celular, no entanto a sua expressão pode ser induzida por fatores de crescimento ou por agentes que danifiquem o DNA (Mighell, 1995; Mukaratirwa, 2005; De Oliveira *et al.*, 2008).

Os estudos que abordam o índice de PCNA como marcador de prognóstico foram realizados em linfomas caninos, mastocitomas, melanomas e tumores mamários (Mukaratirwa, 2005).

1.3.4. AgNOR

As NORs são subestruturas nucleares envolvidas na transcrição ribossomal de RNA e que contêm proteínas argirofílicas (AgNORs). As AgNORs *Agyrophilic Nucleolar Organizer Regions* - Regiões Organizadoras Nucleolares Argirofílicas são proteínas nucleolares que se acumulam em células que se encontram em proliferação. Nas células em proliferação a quantidade de proteínas AgNOR aumenta na interfase, desde a fase G1, atingindo o seu pico máximo no fim da fase S e mantendo-se constante até à fase G2 (Sirri *et al.*, 2000). A quantidade de proteínas AgNOR encontra-se estritamente relacionada com a rapidez da proliferação celular (Sirri *et al.*, 2000). Sendo assim, ao contrário do índice Ki-67 e do índice PCNA, os quais medem a percentagem de células em proliferação, a contagem de AgNOR fornece informação sobre a rapidez da proliferação celular (taxa de proliferação) e pode ser determinada recorrendo a métodos imunohistoquímicos em secções histológicas (Mukaratirwa, 2005). Durante uma elevada atividade de transcrição as proteínas argirofílicas são segregadas, resultando num aumento do número e área de AgNORs impregnadas com prata. Os AgNORs podem ser quantificados como número por célula, área por célula ou rácio de área de AgNORs por área nuclear (Klopfleisch *et al.*, 2011).

A contagem de AgNOR utilizada em vários estudos tem demonstrado fornecer informação clínica útil à cerca do prognóstico tanto em Oncologia Veterinária como em Oncologia Humana (Simões *et al.*, 1994; Destexhe *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 1995; Kiupel *et al.*, 1999; Sarli *et al.*, 2002). O valor prognóstico do AgNOR tem sido estudado em apenas alguns tumores caninos, nomeadamente, em mastocitomas e tumores mamários (Bostock *et al.*, 1989; Simoes *et al.*, 1994; Lohr *et al.*, 1997; Sarli *et al.*, 2002). No entanto, existem

diferentes técnicas de coloração histoquímica de AgNOR, o que impossibilita a comparação entre os resultados dos estudos realizados por diferentes laboratórios. Assim sendo, esta técnica não foi adotada como uma técnica de rotina, dado que cada laboratório teria de validar a sua própria técnica de coloração. Na tentativa de resolver este problema, em 1994 formou-se um comité internacional de padronização que publicou um método padronizado reproduzível de coloração (Aubele *et al.*, 1994). No entanto, não existem estudos em Medicina Veterinária que reportem a utilização dos métodos padronizados (Scase *et al.*, 2006).

1.3.5. Contagem mitótica

O número total de figuras mitóticas em 10 HPF (*high power fields* – campo de grande ampliação) pode ser reportado através da contagem mitótica (CM) ou do índice de atividade mitótica (IAM) (Meuten *et al.*, 2017). O IAM trata-se do número de figuras mitóticas em 10 HPF/área, no entanto, normalmente, o valor reportado é a contagem total e não a fracção (Jannink *et al.*, 1995; Skaland *et al.*, 2008; Al-Janabi *et al.*, 2013). O índice mitótico (IM) é uma fracção entre o número total de figuras mitóticas e o número total de células que não se encontram em mitose. O IM é o método que se correlaciona melhor com os outros meios de determinação da proliferação celular (Ki-67 e PCNA), no entanto os métodos imunohistoquímicos ou histoquímicos são métodos mais precisos e objetivos (Meuten *et al.*, 2017).

A contagem mitótica pode ser determinada em amostras coradas com hematoxilina-eosina e continua a ser o método mais tradicional, simples, rápido e de baixo custo. Este método permite estimar a proliferação celular em neoplasias mamárias em humanos (Elston & Ellis, 1991; Weidner *et al.*, 1994; Aranda & Laforga, 1997) e pode ser utilizado como indicador de prognóstico em humanos com carcinoma mamário (Le Doussal *et al.*, 1989; Layton & Hopkins, 1993). Ainda assim, a validade da contagem mitótica mantém-se controversa, uma vez que o método não se encontra padronizado, existindo discordância entre patologistas no que consiste uma figura mitótica (Mukaratirwa, 2005; Dutra *et al.*, 2008). Em alguns casos, os patologistas podem ter dificuldade em distinguir entre mitose e necrose (núcleo cariorrético e picnótico) e em identificar a prófase e a anafase, em amostras coradas com hematoxilina-eosina (Mukaratirwa, 2005). Van Diest *et al.* (1992) demonstrou que

quando são aplicados critérios estritos à forma como se reconhece e conta as figuras mitóticas é possível obter uma boa concordância inter-observador.

Em Oncologia Veterinária o índice mitótico tem sido utilizado tanto para o diagnóstico como para o prognóstico de vários tumores (Mukaratirwa, 2005; Luong *et al.*, 2006; Spangler & Kass, 2006; Romansik *et al.*, 2007; Sanchez *et al.*, 2007). Vários estudos reportam o valor prognóstico do índice mitótico em tumores caninos, nomeadamente, melanomas (Bostock, 1979), sarcomas de tecidos moles (Bostock & Dye, 1980), hemangiopericitomas (Graves *et al.*, 1988), mastocitomas (Bostock *et al.*, 1989), tumores mamários (Sarli *et al.*, 2002) e tumores esplênicos de origem não vascular e não linfóide (Spangler *et al.*, 1994). Um elevado índice mitótico nestes tumores está associado a uma elevada recorrência após excisão cirúrgica e a um menor tempo de sobrevida (Mukaratirwa, 2005).

A contagem mitótica ou índice de atividade mitótica pode facilmente ser utilizado como procedimento de rotina nas avaliações histopatológicas, sendo a sua maior vantagem o facto de poder ser determinado ao mesmo tempo que o diagnóstico histopatológico (Mukaratirwa, 2005).

1.4. Tumor Mamário Canino

Os tumores mamários caninos (TMCs) são a neoplasia mais prevalente em cadelas não esterilizadas (Lana *et al.*, 2007), sendo que cerca de 40% a 50% apresenta um comportamento maligno (Misdorp *et al.*, 1999; Sorenmo, 2003). Os tumores mamários malignos apresentam frequentemente um prognóstico reservado a mau, devido às altas taxas de recidiva local e de metastatização (Gilbertson *et al.*, 1983; Kurzman & Gilbertson, 1986). O risco de incidência de TMCs aumenta com a idade (Schneider, 1970; Taylor *et al.*, 1976), sendo que apesar da longevidade de cada raça ter influência na idade à qual os TMCs surgem (Egenvall *et al.*, 2005; Rivera *et al.*, 2009), estes afetam em média cães com 10/11 anos (Ginn *et al.*, 2007).

Vários estudos relatam que fatores como o tamanho do tumor (De Las Mulas *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2009), o tipo histológico (Hellmén *et al.*, 1993), o grau histológico (Peña *et al.*, 1998, Karayannopoulou *et al.*, 2005), o crescimento (Sarli *et al.*, 2002; De Las Mulas *et al.*, 2005), e a metastatização dos linfonodos (Pérez-Alenza *et al.*, 1997; Nieto *et al.*, 2000)

influenciam o prognóstico dos tumores mamários malignos caninos. O grau histológico do tumor, demonstrou fornecer informação particularmente significativa à cerca do prognóstico (Gilbertson *et al.*, 1983; Simon *et al.*, 2006).

Apesar de alguns marcadores de proliferação (Sarli *et al.*, 2002; Matos *et al.*, 2006), recetores hormonais (Nieto *et al.*, 2000; De Las Mulas *et al.*, 2005; Gama *et al.*, 2008; Sassi *et al.*, 2010) e oncogenes (Ferreira *et al.*, 2009; Hsu *et al.*, 2009) terem demonstrado ser potenciais biomarcadores de prognóstico em TMCs, não existe um grande número de estudos prospetivos em Medicina Veterinária, o que, conseqüentemente, torna a sua utilização pouco comum na prática clínica. Deste modo, uma vez que os TMCs apresentam características patológicas e comportamento clínico bastante variáveis, torna-se necessária a investigação futura de marcadores moleculares com valor prognóstico e preditivo, para que se estabeleçam indicadores de prognóstico confiáveis, de modo a estimar o risco individual de cada paciente (Nieto *et al.*, 2000; Kurilj *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2013). No entanto, a importância atribuída por vários autores aos TMCs como modelos biológicos para o estudo de tumores mamários em humanos tem contribuído para o crescente interesse em pesquisas sobre o tema (Raynaud *et al.*, 1981; Mottolese *et al.*, 1994; Vail & MacEwen, 2000; Lee *et al.*, 2004; Lavallo *et al.*, 2009; Queiroga *et al.*, 2011). Assim sendo, têm surgido métodos que permitem a avaliação da atividade proliferativa *in situ*, tais como a detecção imunohistoquímica do Ki-67 e PCNA e a quantificação de AgNOR, aumentando assim o interesse da sua aplicação para fins diagnósticos e prognósticos (Sarli *et al.*, 2002).

Apesar de muitos estudos demonstrarem o valor prognóstico da proliferação celular nos TMCs (Peña *et al.*, 1998; Nieto *et al.*, 2000; Sarli *et al.*, 2002; Zuccari *et al.*, 2004; Matos *et al.*, 2006), os resultados são por vezes controversos, o que justifica a necessidade de realização de mais estudos nesta área. Existem estudos que revelaram uma associação entre a atividade proliferativa dos TMCs e diversas variáveis clínicas e patológicas, como grau histológico, pleomorfismo nuclear, ausência de recetores hormonais, metástases e taxa de sobrevivência (Pérez Alenza *et al.*, 1995; Peña *et al.*, 1998; Geraldine *et al.*, 2000). Nos TMCs o índice de Ki-67 demonstrou estar relacionado com a malignidade do tipo histológico (Geraldine *et al.*, 2000; Muto *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2006; Morris *et al.*, 2009).

Peña *et al.* (1998) verificaram que animais com um baixo índice de Ki-67 apresentavam maior tempo livre de doença e de sobrevivência e que existia uma associação significativa entre o índice de Ki-67 e o estado de metastização dos linfonodos. Os dados deste estudo suportaram a relação entre o grau do tumor e o índice de Ki-67. Os autores

referem ainda que observaram uma correlação significativa entre o Ki-67 e o PCNA no grupo das displasias e tumores benignos, mas não nos tumores malignos. Os autores atribuem esta ausência de correlação nos tumores malignos aos elevados valores de PCNA e à sua presença nas células não cíclicas. Este estudo, concluiu assim, que um índice elevado de Ki-67 era um parâmetro prognóstico objetivo para prever o comportamento dos carcinomas mamários caninos.

Zuccari *et al.* (2008) verificaram uma associação entre os carcinomas e a elevada expressão de Ki-67. Estes resultados confirmam os dados reportados por outras literaturas em que referem que o Ki-67 é um marcador para carcinomas e que sugere um mau prognóstico (Zuccari *et al.*, 2004).

O estudo de Sarli *et al.* (2002) revelou que o índice de Ki-67 apresentava relevância prognóstica tal como em investigações anteriores (Penã *et al.*, 1998), no entanto os autores consideram difícil de comprovar que a informação fornecida pelo índice de Ki-67 seja mais útil do que a informação fornecida por uma variável histológica, como por exemplo, o grau de invasão (Sarli *et al.*, 2002).

Dutra *et al.* (2008) observaram uma correlação positiva entre o índice de Ki-67 e a contagem mitótica, o que suporta o facto do Ki-67 ser um indicador eficaz da atividade proliferativa em tumores mamários caninos.

Kurilj *et al.* (2011) utilizou um *cutoff* de 20% para o índice de Ki-67 e verificou que a maioria dos tumores benignos tinham um índice de Ki-67 inferior a 20% (média de 9,1%), sendo que a expressão de Ki-67 foi significativamente elevada em lesões malignas (média de 29,5%). Neste estudo, o Ki-67 foi proporcional ao grau histológico, tal como descrito por Penã *et al.* (1998), Geraldés *et al.* (2000), Matos *et al.* (2006), Thuróczy *et al.* (2007) e Morris *et al.* (2009).

Santos *et al.* (2013) verificaram que o índice de Ki-67 estava fortemente associado ao desenvolvimento de recorrências/metástases distantes bem como a um curto tempo livre de doença e de sobrevida. Neste estudo, metade dos animais com tumores com índice superior a 40% desenvolveram recorrência local e/ou metástases distantes e 42% morreram em dois anos após a cirurgia.

Sennazli *et al.* (2015) referem que um índice de Ki-67 elevado parece estar associado a um elevado grau de malignidade em tumores mamários caninos. Este artigo refere também que o índice de Ki-67 é um fator de prognóstico valioso associado à agressividade e ao grau de diferenciação tumoral.

Um estudo publicado em 2016 (Carvalho *et al.*, 2016), no qual foi utilizado um *cutoff* de 22% para o índice de Ki-67 intratumoral e de 14% para o índice de Ki-67 nas glândulas mamárias não neoplásicas adjacentes, verificou que os valores médios do índice de Ki-67 estavam estatisticamente correlacionados com o índice de Ki-67 das glândulas mamárias não neoplásicas adjacentes, tanto em tumores benignos como em tumores malignos. O índice de Ki-67 intratumoral estava significativamente associado ao tipo histológico, índice mitótico, grau nuclear, grau de diferenciação, grau histológico de malignidade e envolvimento dos linfonodos. A média de valores do índice de Ki-67 em glândulas mamárias não neoplásicas adjacentes estava significativamente associado ao tamanho do tumor, índice mitótico, grau nuclear, grau de diferenciação, grau histológico de malignidade e envolvimento dos linfonodos regionais. Neste estudo, o elevado índice de Ki-67 intratumoral e o elevado índice de Ki-67 nas glândulas mamárias não neoplásicas adjacentes encontrava-se associado significativamente a um menor tempo de sobrevida. Os autores consideram que os fatores de crescimento produzidos pelo tumor poderão atuar nas glândulas mamárias não neoplásicas adjacentes por sinalização parácrina, contribuindo para um microambiente tumoral altamente proliferativo.

1.5. Carcinoma Mamário Felino

A neoplasia mamária é uma doença observada predominantemente em gatos de meia-idade e mais velhos, sendo que a idade média do diagnóstico é entre 10 e 12 anos de idade (Dorn *et al.*, 1968; Hayden *et al.*, 1971; Weijer *et al.*, 1972; Misdorp *et al.*, 1991).

Os tumores mamários felinos (TMFs), segundo o Registo de Neoplasia Animal da Califórnia (CANR) são a terceira neoplasia mais frequente em gatas, com uma taxa de incidência anual de 25,4/100.000 e representam 12% dos tumores em gatos, independentemente do sexo (Dorn *et al.*, 1968). Vascellari *et al.* (2009) num estudo em duas províncias do norte da Itália relataram que os tumores mamários felinos representavam 16% de todos os tumores em gatos e 25% dos tumores em fêmeas (Vascellari *et al.*, 2009). Egenvall *et al.* (2010) reportam os tumores mamários felinos como o tumor mais comum, tendo estes uma incidência de 40% nesta espécie. Ao contrário dos cães e dos humanos, 80% a 96% dos tumores mamários felinos tem comportamento maligno, sendo que a maioria são carcinomas (Moulton, 1978; Bostock, 1986a). Cerca de 80% a 90% são carcinomas simples

hormono-independentes (envolvem um único componente celular neoplásico: luminal epitelial) (Nielsen, 1967; Hayden, *et al.*, 1989; Misdorp *et al.*, 1999) e os tipos histológicos mais comuns são: carcinomas tubulares, papilares, sólidos e cribiformes (Sorenmo, 2013). As taxas de metastização variam de 50% a 90%, sendo que os linfonodos (83%), pulmões (83%), fígado (25%) e pleura (22%) são os locais de metastização mais frequentes (Hahn & Adams, 1977; Hahn *et al.*, 1994).

Existem alguns estudos em carcinomas mamários felinos (CMFs) que correlacionam a idade, tamanho do tumor, metastização regional e grau de malignidade com a sobrevida (Weijer & Hart, 1983; MacEwen *et al.*, 1984; Seixas *et al.*, 2011), no entanto existe pouca informação relacionada com o índice de proliferação. Assim sendo, o estudo de outros fatores de prognóstico pode fornecer informação útil relativamente à biologia do tumor, permitindo a escolha de uma terapia adequada e, conseqüentemente, um melhor acompanhamento dos pacientes (Soares *et al.*, 2016).

Ao longo do tempo, tem vindo a ser proposto o uso de alguns índices proliferativos (De Vico *et al.*, 1995; Castagnaro *et al.*, 1998a; Castagnaro *et al.*, 1998b; Funakoshi *et al.*, 2000), tais como a quantificação de proteínas AgNOR, o índice mitótico e a deteção imunohistoquímica de antigénios (PCNA e Ki-67) para fins diagnósticos e prognósticos.

Em Medicina Veterinária, apesar do índice de Ki-67 ter sido investigado como fator de prognóstico nos CMFs, não existem muitos dados que avaliem a correlação entre este índice e o tempo de sobrevida (Millanta *et al.*, 2002; Preziosi *et al.*, 2002; Seixas *et al.*, 2011) e não existe um protocolo padrão para a avaliação da proliferação celular através da IHQ do Ki-67. A falta de dados relativamente ao nível do *cutoff* explica a inexistência de valores validados para o CMF (Castagnaro *et al.*, 1998b; Preziosi *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2004; Seixas *et al.*, 2011). No entanto, Soares *et al.* (2016) realizaram um estudo no qual, tendo em conta os resultados obtidos, sugeriram a utilização de um valor ótimo de *cutoff* para CMFs de 14%. Este estudo baseou-se nos valores de *cutoff* reportados em Medicina Humana, sendo que, recentemente, foi recomendada a uniformização do *cutoff* de Ki-67 a 14% para o cancro da mama na mulher (Cheang *et al.*, 2009).

Vários estudos em CMFs relacionam a malignidade de uma lesão a um índice de Ki-67 mais elevado e um índice de Ki-67 mais baixo a lesões benignas (Castagnaro *et al.*, 1998b; Millanta *et al.*, 2002; Preziosi *et al.*, 2002; Burrai *et al.*, 2010; Rasotto *et al.*, 2011; Seixas *et al.*, 2011).

Num estudo em que os pacientes foram acompanhados um ano após a cirurgia, Castagnaro *et al.* (1998b) demonstraram que um valor de Ki67 <25,2%, estava significativamente associado ao aumento da sobrevida. Resultados semelhantes foram obtidos por Rasotto *et al.* (2011).

Seixas *et al.* (2011) concluíram que o Ki-67 estava relacionado com tempo de sobrevida, no entanto não estava significativamente associado ao tempo livre de doença. Neste estudo o tempo de sobrevida foi de 7 meses em animais com índice de Ki-67 >36,1% e de 14 meses em animais com índice de Ki-67 < 36,1%. Seixas *et al.* (2011) referiram assim, que o índice de Ki-67 pode ser usado para distinguir as gatas com bom e mau prognóstico, tal como o índice mitótico. Estes resultados estão de acordo com estudos previamente publicados por Weijer & Hart (1983) e Castagnaro *et al.* (1998b).

Preziosi *et al.* (2002) e Millanta *et al.* (2002) referem que o índice de Ki-67 não foi significativo na previsão do prognóstico em CMFs.

Soares *et al.* (2016) desenvolveram um estudo no qual pretenderam validar o valor prognóstico do índice de Ki-67 nos CMFs e determinar o melhor valor de *cutoff*. Este estudo evidenciou uma correlação forte e positiva entre o índice de Ki-67 do tumor primário e o índice de Ki-67 das metástases locais e distantes. Soares *et al.* (2016) confirmaram a associação entre a sobre expressão do Ki-67 no tumor primário e o comportamento agressivo do tumor, uma vez que as lesões metastáticas apresentaram índices de Ki-67 superiores (média de 48,2%) às lesões primárias (26%). Os autores consideraram que o valor de *cutoff* que melhor prevê o resultado clínico dos CMFs é de 14%, sendo que observaram um risco de morte associada ao tumor de 2,4x superior em gatos com tumores primários com índice de Ki-67 superior ou igual a 14%. Para além disso, os autores observaram ainda uma forte associação entre os níveis de Ki-67 e o tamanho do tumor (Weijer & Hart, 1983; MacEwen *et al.*, 1984), o grau de malignidade (Seixas *et al.*, 2011), a presença de áreas de necrose (Pereira *et al.*, 2004; Seixas *et al.*, 2011) e a baixa expressão de recetores de estrogénio (RE) (Millanta *et al.*, 2006), o que reforça a relevância deste marcador no acompanhamento clínico dos CMFs (Soares *et al.*, 2016)

1.6. Mastocitoma

O mastocitoma (MCT) é o tumor cutâneo mais comum em cães e representa cerca de 16 a 21% da totalidade dos tumores cutâneos (Brodey, 1970; Finnie & Bostock, 1979; Bostock, 1986b; Rothwell *et al.*, 1987). Os mastocitomas afetam qualquer raça, no entanto os Golden Retrievers, Labradores Retrievers, Boston Terriers, Boxers e Pugs são raças mais predispostas. Um estudo revelou que os Pugs têm maior predisposição para apresentar múltiplos MCTs ao diagnóstico (56%), no entanto estes tumores demonstram um comportamento mais benigno, resultando raramente em morte (McNiel *et al.*, 2006). Os MCTs podem afetar cães de qualquer idade, no entanto, normalmente, surgem em cães de meia idade a geriátricos. Embora não exista nenhuma etiologia identificada na maioria dos tumores, 25-30% dos tumores de grau intermédio a elevado apresentam mutações no recetor tirosina-quinase c-Kit (Downing *et al.*, 2002; Letard *et al.*, 2008). Os MCTs podem estar localizados em qualquer parte do corpo e podem apresentar-se entre o tecido subcutâneo e/ou a derme e têm uma aparência muito variada, desde nódulos muito superficiais, móveis e de consistência branda a muito profundos, fixos e firmes (Garrett, 2014).

O grau histológico dos mastocitomas é considerado o fator de prognóstico mais consistente e confiável disponível, embora não permita prever o comportamento de todos os tumores (Bostock, 1973; Patnaik *et al.*, 1984; Simões *et al.*, 1994; Murphy *et al.*, 2004). A classificação do grau histológico pode ser feita com base em dois sistemas de classificação diferentes, o sistema de Patnaik *et al.* (1984) e o sistema de Kiupel *et al.* (2011). O sistema de classificação proposto por Patnaik *et al.* (1984) classifica os tumores em três graus (grau I: bem diferenciado; grau II: diferenciação intermédia; grau III: pouco diferenciado ou anaplásico), tendo em conta a extensão da lesão, a celularidade, a morfologia celular, o número de mitoses e a reação estromal. Tendo em conta este sistema de classificação os mastocitomas de grau I raramente apresentam metastização e estão associados a tempos de sobrevida mais longos e a um melhor prognóstico. Os mastocitomas de grau III apresentam um comportamento mais agressivo, maior probabilidade de metastização e pior prognóstico. Os tumores de grau II podem apresentar diferentes comportamentos biológicos, sendo difícil prever o prognóstico nestes casos (Patnaik *et al.*, 1984; Kiupel *et al.*, 2011; Thompson *et al.*, 2011; Blackwood *et al.*, 2012). O sistema de classificação de Kiupel *et al.* (2011) foi recentemente desenvolvido na tentativa de colmatar a limitação do Sistema de Patnaik em relação aos MCTs de grau II. Este sistema classifica os tumores em dois graus, baixo grau e

alto grau, sendo que o diagnóstico dos tumores classificados como de alto grau baseia-se na presença de qualquer um dos seguintes critérios: pelo menos sete figuras mitóticas / 10 HPF, pelo menos três células multinucleadas / 10 HPF, pelo menos três núcleos bizarros / 10 HPF, ou cariomegalia (Kiupel *et al.*, 2011).

Dado que o grau histológico é muito variável e subjetivo foram desenvolvidos outros fatores de prognóstico, tais como a aneuploidia do DNA, o padrão de coloração do c-kit, a presença de mutações c-kit, a densidade de microvasos, Ki-67, PCNA e IM na tentativa de prever o comportamento biológico dos MCTs grau II (Garrett, 2014).

O Ki-67, PCNA e AgNOR têm sido usados como marcadores de proliferação em MCT cutâneos e vários estudos demonstraram que estes se correlacionam com o comportamento biológico do tumor (Bostock *et al.*, 1989; Simoes *et al.*, 1994; Kravis *et al.*, 1996; Abadie *et al.*, 1999; Scase *et al.*, 2006).

Existem vários estudos que reportam diferentes valores de *cutoff* para o índice de Ki-67 e Vascellari *et al.* (2013) justificam as diferenças entre os vários valores reportados com a utilização de diferentes métodos de contagem da fração de células Ki-67 positivas e sugerem a standardização do método de contagem das mesmas.

Vascellari *et al.* (2013) definiram que os animais que apresentam um valor de índice de Ki-67 igual ou superior ao *cutoff* de 10,6% têm uma mortalidade até oito vezes superior.

Abadie *et al.* (1999), Scase *et al.* (2006) e Maglennon *et al.* (2008) referem que o Ki-67 é um marcador imunohistoquímico útil como marcador de prognóstico em todos os graus de MCT e reportam que é possível dividir os MCTs de grau intermédio com base no índice de Ki-67.

Abadie *et al.* (1999) reportaram que a contagem superior ou igual a 93 núcleos Ki-67 positivos em 1000 células tumorais (*cutoff* de 9,3%) foi associada a uma menor sobrevivência em MCTs de grau intermédio.

Scase *et al.* (2006) dividiram os MCTs de grau intermédio com base no índice de Ki-67, utilizando um *cutoff* de 1,8%, sendo que obtiveram uma probabilidade de sobrevivência de 1, 2 e 3 anos menor em cães com um índice de Ki-67 superior a 1,8%.

Maglennon *et al.* (2008) reportaram uma mediana de sobrevivência de 292 dias em casos de MCTs de grau intermédio com um índice de Ki-67 >1,8% e não obtiveram mediana de sobrevida em casos com um índice de Ki-67 <1,8% (Maglennon *et al.*, 2008). Os autores deste último estudo referem ainda que o valor *cutoff* de 1,8% para o índice de Ki-67 maximiza a especificidade, minimizando o número de falsos positivos e sugerem que a alternativa seria

definir um valor de *cutoff* que minimizasse a taxa de falsos negativos, de modo a minimizar o número de cães que morrem sem beneficiarem de um tratamento mais agressivo. No entanto, não foi possível obter um valor de *cutoff* que reduzisse os falsos negativos, sem diminuir a especificidade (Maglennon *et al.*, 2008). Este estudo sugere que a maioria dos cães com teste de Ki-67 negativo (Índice de Ki-67 $\leq 1,8\%$) terão um excelente prognóstico, uma vez que apenas 5% dos cães com índice de Ki-67 $\leq 1,8\%$ morreram devido ao MCT. Maglennon *et al.* (2008) também verificaram que a maioria dos cães com índice de Ki-67 $> 1,8$ morreram devido ao MCT.

Apesar de já ter sido demonstrado por vários autores, serão necessários mais estudos que demonstrem a potencial utilidade do Ki-67 para distinguir os MCTs de grau intermédio de comportamento benigno e maligno.

Berlato *et al.* (2013) demonstraram que tanto o IM como o índice de Ki-67 permitem prever o tempo de sobrevida dos cães com MCT independentemente do grau histológico (sistema de classificação de Patnaik). A principal limitação do sistema de classificação de Patnaik é o facto de não permitir a previsão do prognóstico de MCTs de grau intermédio. Este estudo utilizou um *cutoff* de 5 para o IM e 1% para o índice de Ki-67 nos três graus histológicos e 1,8% para o índice de Ki-67 no grau histológico intermédio. Assim sendo, Berlato *et al.* (2013) diferenciaram dois subgrupos com prognósticos diferentes dentro do grau intermédio através do índice mitótico (valor *cutoff* de 5) e do índice de Ki-67 (valor *cutoff* de 1,8%). Apesar do IM estar frequentemente incluído no relatório histopatológico da maioria dos laboratórios, os autores sugerem a requisição do índice de Ki-67 em algumas situações, nomeadamente, quando existe discordância entre a história, as características do tumor e o índice mitótico. Os autores referem ainda que não é necessário a realização do índice de Ki-67 em cães com metástases nos linfonodos ou com metástases distantes, uma vez que estes casos já estão associados a um mau prognóstico. No entanto, os autores consideram que faz sentido investigar a atividade proliferativa num cão com múltiplos mastocitomas, mas sem metastização nos linfonodos, dado que o prognóstico depende das características de cada tumor individualmente (Berlato *et al.*, 2013).

S. Lelyveld *et al.* (2015) realizaram um estudo cujo objetivo foi comparar os valores do índice de Ki-67 e do índice mitótico obtidos através de laboratórios comerciais e avaliar a sua correlação e concordância. Neste estudo foi utilizado o *cutoff* de 5 para o IM e foram tidos em conta diferentes valores de *cutoff* para o índice de Ki-67 consoante o laboratório que avaliou a amostra, tendo sido avaliados 137 casos de acordo com o valor de *cutoff* de 1,8%,

24 casos de acordo com o valor de *cutoff* de 9,3% e 1 caso consoante o *cutoff* de 23 células positivas/*grid area*. A correlação obtida entre o índice de Ki-67 e o IM foi moderada, no entanto a concordância foi fraca. O IM subestimou a severidade da doença, enquanto que o índice de Ki-67 sobrestimou a severidade da doença, sendo que este último foi muito sensível, mas pouco específico a prever a morte associada ao MCT. Posteriormente, os autores utilizaram um *cutoff* de 2 para IM, o que permitiu melhorar a sensibilidade e manter a especificidade, sugerindo que neste estudo, o IM foi o melhor indicador de morte causada por MCT. Os autores deste estudo, referem que com o *cutoff* de 2, o IM aparenta ser tão bom ou até melhor que o Ki-67 a prever o comportamento tumoral e sugerem ainda a estratificação do IM em três grupos, tendo o grupo intermédio um valor entre 2-7, tal como um estudo preliminar de Elston *et al.* (2009). Neste estudo o índice de Ki-67 foi útil para fornecer informação adicional sobre o prognóstico nos animais com $IM < 2$ ($P=0,009$), no entanto nos animais com $IM \geq 2$ não foi útil para prever a taxa de sobrevivência, pelo que os autores referem a necessidade de investigações futuras que se foquem nos marcadores de prognóstico, principalmente no grupo de IM intermédio.

1.7. Objetivo

A utilização do índice de Ki-67 como fator de prognóstico tem ganho popularidade em Medicina Veterinária, no entanto a contagem manual é um método moroso e pouco prático. Assim sendo, o presente estudo tem como objetivo avaliar a aplicação do *plug-in* ImmunoRatio no *software* ImageJ, de modo a obter o índice de Ki-67 em amostras de tumores mamários caninos, carcinomas mamários felinos e mastocitomas. Para tal, avaliou-se a correlação e a concordância entre os valores obtidos através da contagem manual e da análise automatizada (ImmunoRatio) a uma ampliação de 200x.

Para além do objetivo principal acima referido, delinearam-se ainda os seguintes objetivos secundários:

- Definir a melhor metodologia para a análise de amostras no ImmunoRatio através da avaliação:

- da correlação e da concordância entre os resultados da contagem manual a uma ampliação de 200x e a análise automatizada a uma ampliação de 400x;
 - da correlação e da concordância entre os resultados da análise automatizada com a presença e ausência de estroma a uma ampliação de 200x;
 - da correlação e da concordância entre os resultados da contagem manual a uma ampliação de 200x e a análise automatizada com estroma a uma ampliação de 200x;
 - da concordância entre as várias contagens manuais de amostras homogêneas e heterogêneas.
-
- Verificar a capacidade de análise do ImmunoRatio em fotografias de menor ampliação (50x) através da avaliação da concordância entre:
 - o valor médio da contagem manual a 200x de cada amostra e o valor obtido pela análise automatizada a uma ampliação de 50x.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Seleção e Caracterização da Amostra

Foram analisadas um total de 18 amostras, nomeadamente, onze carcinomas mamários felinos, cinco tumores mamários caninos e dois mastocitomas. As amostras de carcinoma mamário felino foram cedidas pela Dra. Maria João Soares através da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa e as amostras de tumor mamário canino e de mastocitoma foram cedidas pela Dra. Inês Carvalho através do DNATech.

Todas as amostras de carcinoma mamário felino foram obtidas a partir de uma área representativa de cada lesão (diâmetro de 0,6 cm) selecionada com o intuito de preparar 5 secções de 3 μm . Posteriormente as secções foram secas a 60°C durante 1 hora e desparafinadas. A recuperação antigénica foi realizada através da fervura das amostras em panela de pressão (2 atm), durante 2 minutos, em solução tampão de citrato de sódio (0.01M NaCH₃COO, pH 6.0). A análise imuno-histoquímica para Ki67 foi realizada com o anticorpo policlonal (Thermo Scientific) numa diluição de 1:500, sendo que este foi incubado à temperatura ambiente durante 60 minutos. A coloração foi obtida através do sistema de visualização método de conjugação modificado estreptavidina-peroxidase Novolink MaxPolymer Detection System (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha). Por fim, realizou-se o contraste das secções com Hematoxilina de Mayer (Merck, NJ, EUA).

As amostras de tumores mamários caninos e amostras de mastocitomas foram obtidas a partir de uma área representativa de cada lesão, impregnadas em parafina, submetidas a cortes de 3-4 μm e colocadas em lâminas adesivadas. Posteriormente, os cortes permaneceram na estufa a 37° durante a noite e, no dia seguinte, foram desparafinados. A recuperação antigénica foi realizada no Módulo PT (Thermo Scientific) em solução tampão Tris-EDTA, pH8, durante 10 minutos. A análise imuno-histoquímica para Ki67 foi realizada com o anticorpo monoclonal (SP6, Ref. 275R-14, Cell Marque™) numa diluição de 1:50, sendo que este foi incubado à temperatura ambiente durante 30 minutos. A coloração foi obtida através do sistema de visualização HiDef Detection™ HRP Polymer System (Cell Marque™) e DAB. Por fim, realizou-se o contraste das secções com hematoxilina.

As lâminas foram digitalizadas através do digitalizador de lâminas HAMAMATSU NanoZoomer-SQ Digital slide scanner C13140-01 com o *software* NDPI view, tendo-se obtido as imagens para posterior contagem manual e automatizada (ImmunoRatio).

Para a realização da contagem manual e da análise automatizada (ImmunoRatio) foram selecionados cinco campos aleatórios em amostras homogêneas e, três campos aleatórios e três campos com um elevado número de células Ki-67-positivas (*hotspots*) em amostras heterogêneas, obtendo-se um total de 102 observações individuais (n=102).

2.2. Contagem Manual

A contagem manual foi realizada em imagens com uma ampliação de 200x (≈ 1000 células) por um operador, utilizando o *software* ImageJ com o auxílio do *plug-in Cell Counter*, o qual permite a seleção manual de diferentes tipos de células. Inicialmente, selecionou-se o tipo celular que se tencionava contar e, seguidamente, clicou-se nos elementos da imagem pretendidos, surgindo na imagem um número colorido correspondente ao tipo celular selecionado e obtendo-se uma atualização do contador sempre que se realizou um novo “click”, permitindo, no final, obter um valor total de todos os “clicks” realizados. Neste trabalho utilizou-se o número 1 com cor azul para marcar as células Ki-67 negativas e o número 2 com cor vermelha para marcar as células Ki-67 positivas (Figura 1). O índice de Ki-67 foi obtido através da razão entre as células Ki-67 positivas e o número total de células da imagem.

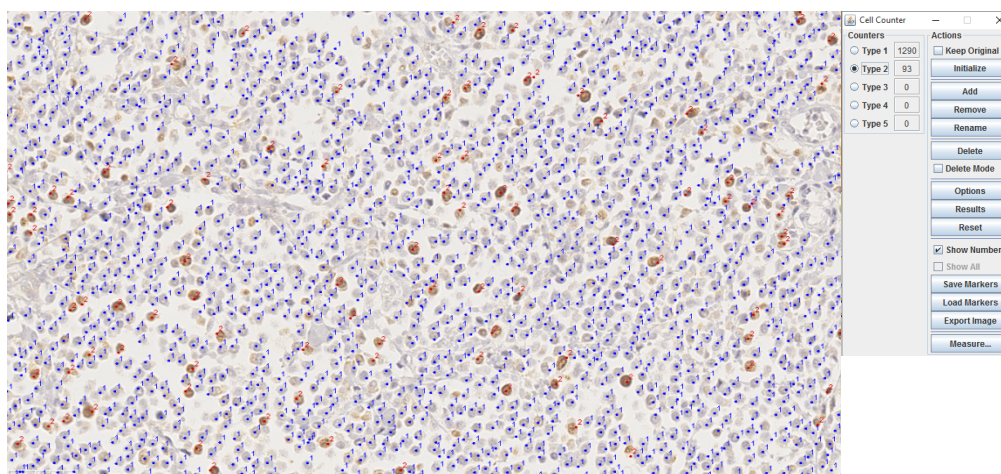


Figura 2 - Mastocitoma 200x - Contagem manual com o auxílio do *plug-in cell counter* no *software* ImageJ. 1 – células negativas para Ki-67; 2 - células positivas para Ki-67.

2.3. Análise Automatizada – ImmunoRatio

A análise automatizada foi realizada em imagens com ampliação de 50x, 200x e 400x através do *plug-in* ImmunoRatio, o qual segmenta os núcleos DAB e hematoxilina da imagem que se pretende analisar, cria uma imagem na qual estes componentes se encontram corados de diferentes cores e calcula a percentagem de área nuclear DAB sobre a área nuclear total.

Para eliminação do estroma nas imagens com ampliação de 200x e 400x, foi utilizada a função *Polygon Selection Tool* do ImageJ-Fiji, a qual permitiu criar seleções de formato irregular definidas por uma série de segmentos de linha (Figura 2). As áreas seleccionadas foram removidas através de função Ctrl+F.

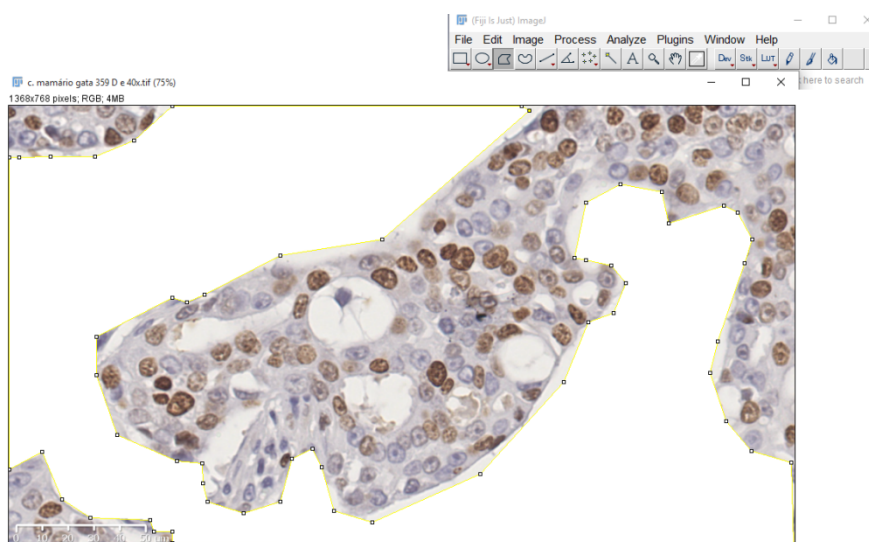


Figura 3 - Carcinoma mamário felino 400x – Exemplo da função Polygon Selection Tool do ImageJ-Fiji para eliminação do estroma.

Neste estudo foi utilizado o modo avançado do *plug-in*, o que permitiu a intervenção do operador na correção do *blankfield*, na especificação manual da escala da imagem original e no ajuste do limiar de hematoxilina (componente azul) e DAB (componente castanho). Os resultados obtidos pelo *plug-in* foram interpretados pelo operador em conjunto com as imagens das lâminas originais (Figura 3 e 4), tal como recomendado pelos autores do *plug-in*.

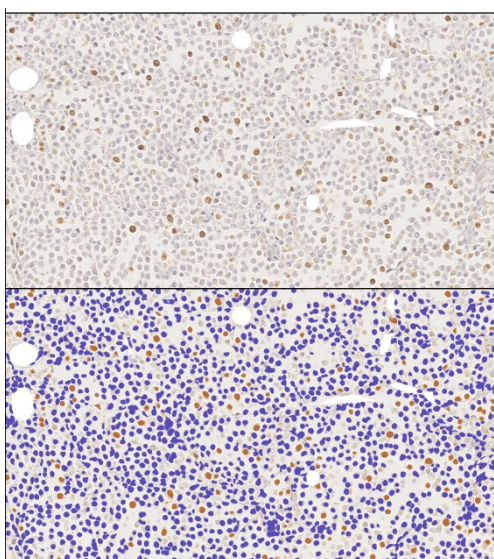


Figura 4 - Mastocitoma 200x - Análise automatizada através do ImmunoRatio. Células a azul – células negativas para Ki-67; células a laranja - células positivas para Ki-67.

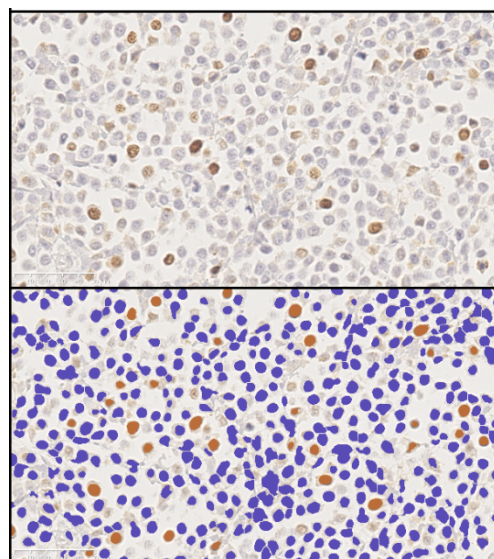


Figura 5 - Mastocitoma 400x - Análise automatizada através do ImmunoRatio. Células a azul – células negativas para Ki-67; células a laranja - células positivas para Ki-67.

2.4. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada pelo *software* estatístico IBM SPSS Statistics 25.

Com o intuito de validar a utilização do *plug-in* ImmunoRatio, as diferentes imagens de cada amostra (cinco imagens no caso das amostras de tumores homogêneos e seis imagens no caso das amostras de tumores heterogêneos) foram avaliadas como observações individuais, obtendo-se um total de 102 observações válidas (n=102). De maneira a comparar a contagem manual (Manual 200x) com o *plug-in* ImmunoRatio em fotografias com uma ampliação de 200x (ImR 200x) foram realizadas duas análises distintas, uma com o objetivo de avaliar correlação e outra com o objetivo de avaliar a concordância.

Para a obtenção da correlação recorreu-se à avaliação da normalidade das amostras através do teste de Shapiro-Wilk. Utilizou-se a correlação bivariada para a determinação dos coeficientes de correlação, tendo sido utilizado o teste não paramétrico de Spearman, após verificados os pressupostos para a realização do teste de hipóteses. Para avaliação da concordância calculou-se o coeficiente de correlação intraclass (ICC). Como nível de

significância adotou-se o valor de 5%, admitindo-se existir uma diferença significativa quando o valor de p se apresentasse inferior a 0,05.

O ICC foi estimado com um intervalo de confiança de 95% (IC) recorrendo a modelos mistos de duas vias para avaliar a consistência entre o método manual e as outras metodologias. Um ICC elevado geralmente indica melhor consistência. Uma vez que não existem valores padrão que sejam universalmente aceites para o ICC, neste estudo foram utilizados os valores estabelecidos para o coeficiente Kappa de modo a facilitar a interpretação dos resultados (Fleiss, & Cohen, 1973): 0,00-0,20 foi interpretado como “fraca”; 0,21 a 0,40 como “razoável”; 0,41 a 0,60 como “moderada”; 0,61-0,80 como “forte”; e > 0,80 como “quase perfeita” (Landis, & Koch, 1977).

Posteriormente, com o objetivo de verificar qual a melhor metodologia, a correlação e a concordância foram ainda analisadas entre a contagem manual e o ImmunoRatio em fotografias com uma ampliação de 400x (ImR 400x), com o objetivo de verificar se fotografias com uma maior ampliação (400x) são representativas das zonas em análise nas fotografias de 200x. Para avaliar a necessidade da remoção de estroma compararam-se os resultados, tanto da contagem manual como do ImmunoRatio 200x sem estroma (ImR 200x), com o ImmunoRatio 200x com estroma (Estroma ImR 200x). Avaliou-se ainda a concordância entre as diferentes contagens manuais de cada amostra, de modo a verificar a variação do valor de Ki-67 entre as várias imagens. Para esta última análise, as amostras foram agrupadas em diferentes grupos: amostras homogéneas (4 carcinomas mamários felinos e 2 mastocitomas) e amostras heterogéneas (7 carcinomas mamários felinos e 5 tumores mamários caninos).

Por fim, foi avaliada a concordância entre o valor médio das contagens manuais de cada amostra e o *plug-in* ImmunoRatio em fotografias com uma ampliação de 50x (ImR 50x).

III. RESULTADOS

3.1. Média e Desvio padrão do Índice de Ki-67

No caso dos tumores mamários caninos, a média do índice de Ki-67 obtido através do ImR 200x foi de $11,6\% \pm 6,7\%$ e a média do índice de Ki-67 obtido através do método manual 200x foi de $12,1\% \pm 7,0\%$. A média da variação entre os valores de índice de Ki-67 obtidos pelo ImmunoRatio e pelo método manual foi de $1,4\% \pm 1,4\%$. A média do índice de Ki-67 obtido através da metodologia Estroma ImR 200x foi de $12,0\% \pm 6,1\%$.

Relativamente aos carcinomas mamários felinos, a média do índice de Ki-67 obtido através do ImR 200x foi de $13,9\% \pm 9,1\%$ e a média do índice de Ki-67 obtido através do método manual 200x foi de $15,9\% \pm 10,4\%$. A média da variação entre os valores de índice de Ki-67 obtidos pelo ImmunoRatio e pelo método manual foi de $2,4\% \pm 1,8\%$. A média do índice de Ki-67 obtido através da metodologia Estroma ImR 200x foi de $13,0\% \pm 8,0\%$.

Nos mastocitomas a média do índice de Ki-67 obtido através do ImR 200x foi de $3,1\% \pm 2,8\%$ e a média do índice de Ki-67 obtido através do método manual 200x foi de $3,5\% \pm 3,5\%$. A média da variação entre os valores de índice de Ki-67 obtidos pelo ImmunoRatio e pelo método manual foi de $0,7\% \pm 0,8\%$. A média do índice de Ki-67 obtido através da metodologia Estroma ImR 200x foi de $2,9\% \pm 2,7\%$.

3.2. Correlação entre as várias metodologias – Coeficiente de correlação de Spearman

Tabela 1 - Coeficientes de correlação do método Manual 200x com as metodologias ImR 200x e ImR 400x.

n	Correlações	Metodologia	ImR 200x	ImR 400x
102	Rho de Spearman (r_s)	Manual 200x	0,973**	0,942**

** n=102; A correlação é significativa no nível 0,01 (2 extremidades).

Todas as correlações, acima referidas (Tabela 1), são classificadas como positivas e fortes, sendo estas também consideradas estatisticamente muito significativas ($P < 0,001$).

A metodologia que apresenta a correlação mais forte com o método Manual 200x é o ImR 200x ($r_s = 0,973$; $P < 0,001$).

Os gráficos seguintes evidenciam a excelente correlação entre o método Manual 200x e o método automatizado a 200x (ImR 200x) (Gráfico 1 e 2) e a elevada correlação entre o método Manual 200x e o método automatizado a 400x (ImR 400x) (Gráfico 1 e 3), uma vez que todos os pontos se encontram muito próximos da linha de tendência.

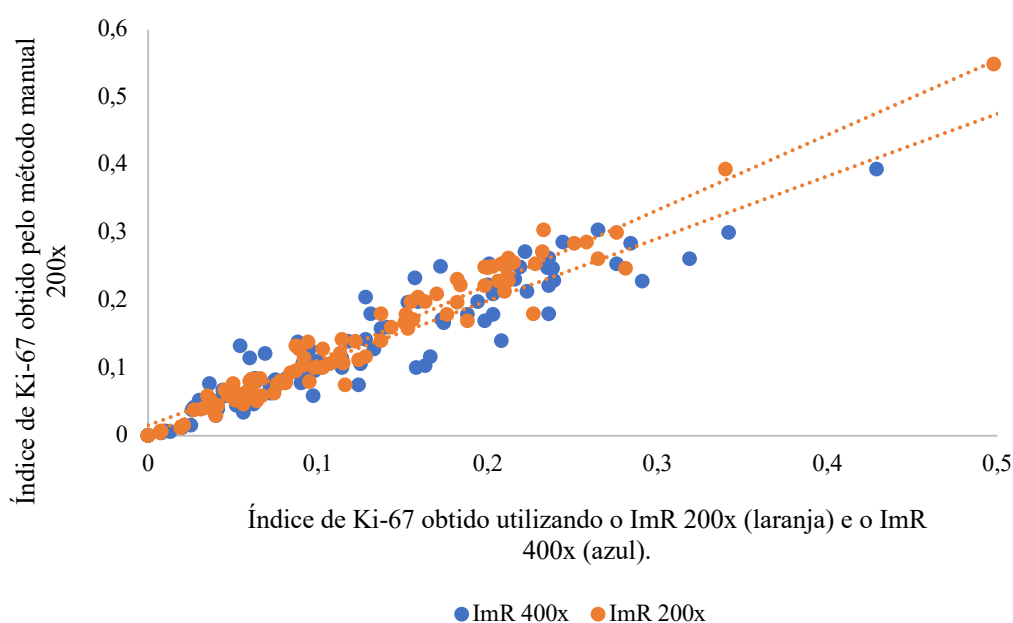


Gráfico 1 - Elevada correlação entre o índice de Ki-67 obtido pelo método Manual 200x e o índice de Ki-67 obtido pelas outras metodologias (ImR 200x, ImR 400x).

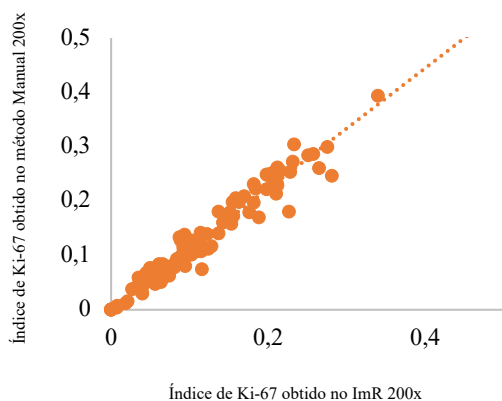


Gráfico 2 - Excelente correlação entre o índice de Ki-67 obtido no método Manual 200x e no ImR 200x.

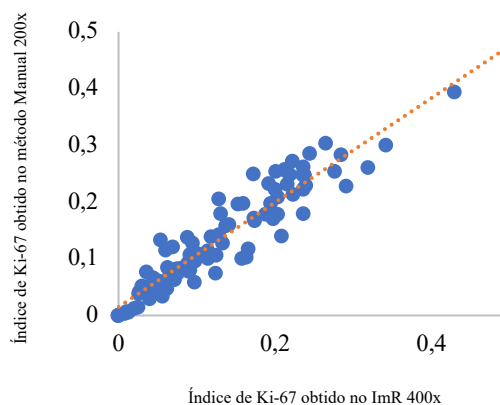


Gráfico 3 - Elevada correlação entre o índice de Ki-67 obtido no método Manual 200x e no ImR 400x.

Tabela 2 - Coeficientes de correlação do método Manual 200x com as metodologias ImR 200x e ImR 400x estratificados pelo tipo de tumor (Tumor mamário canino, Carcinoma mamário felino e Mastocitoma).

n	Correlações	Amostra	Metodologia	ImR 200x	ImR 400x
30	Rho de Spearman (r_s)	Tumor mamário canino	Manual 200x	0,971**	0,909**
62	Rho de Spearman (r_s)	Cacinoma mamário felino	Manual 200x	0,971**	0,940**
10	Rho de Spearman (r_s)	Mastocitoma	Manual 200x	0,960**	0,927**

** A correlação é significativa no nível 0,01 (2 extremidades)

Seguindo a tendência verificada na análise global, todas as correlações são classificadas como positivas, fortes e estatisticamente significativas ($P < 0,001$) na análise estratificada (Tabela 2).

Os tumores mamários caninos e os carcinomas mamários felinos apresentam as correlações mais fortes entre o método Manual 200x e o método ImR 200x ($r_s = 0,971$; $P < 0,001$).

Tabela 3 - Coeficientes de correlação do método Estroma ImR 200x com as metodologias ImR 200x e Manual 200x.

n	Correlações	Metodologia	Estroma ImR 200x
102	Rho de Spearman (r_s)	ImR 200x	0,968**
102	Rho de Spearman (r_s)	Manual 200x	0,952**

**n=102; A correlação é significativa no nível 0,01 (2 extremidades).

Existe uma correlação positiva, forte e estatisticamente significativa tanto entre o método ImR 200x sem estroma e o método ImR 200x com estroma ($r_s = 0,968$; $P < 0,001$),

como entre o método Manual 200x e o método ImR 200x com estroma ($r_s=0,952$; $P<0,001$) (Tabela 3).

Os gráficos seguintes (Gráfico 4, 5 e 6) evidenciam a elevada correlação entre o método Estroma ImR 200x e os métodos sem estroma (Manual 200x e ImR 200x), uma vez que todos os pontos se encontram muito próximos da linha de tendência.

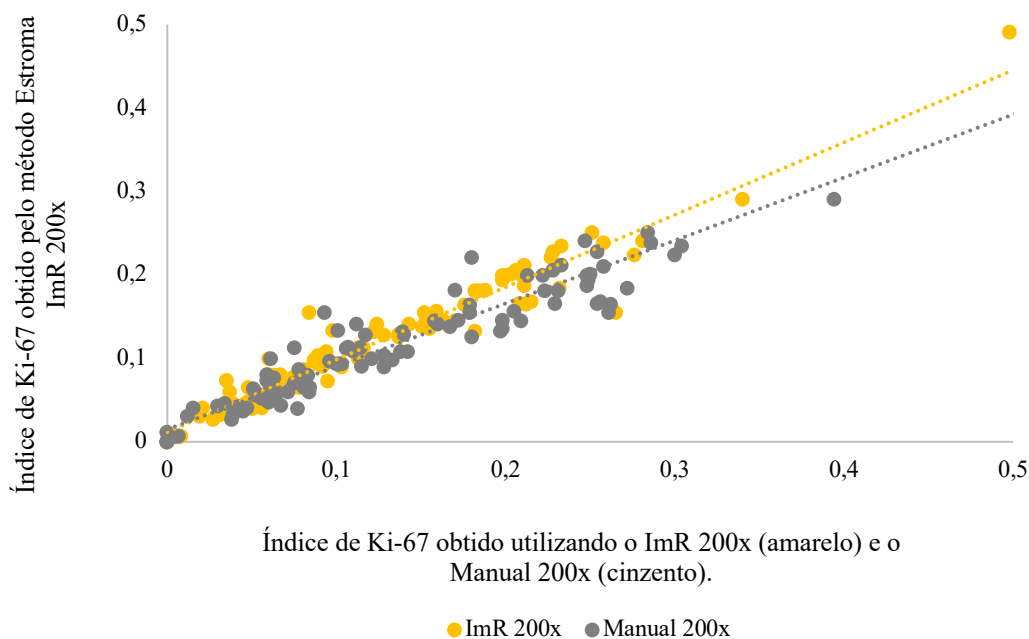


Gráfico 4 - Elevada correlação entre o índice de Ki-67 obtido pelo Estroma ImR 200x e as metodologias sem estroma (ImR 200x e Manual 200x).

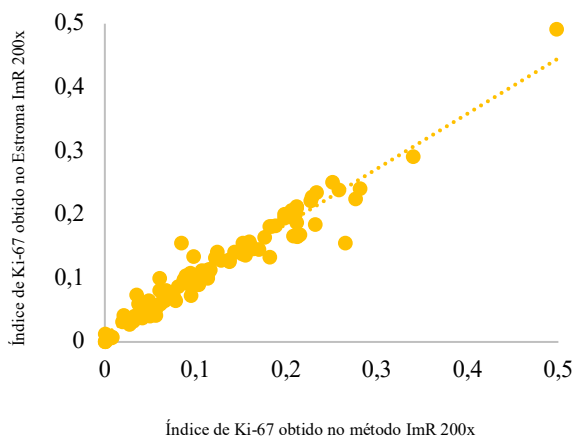


Gráfico 5 - Elevada correlação entre o índice de Ki-67 obtido no método ImR 200x e no Estroma ImR 200x.

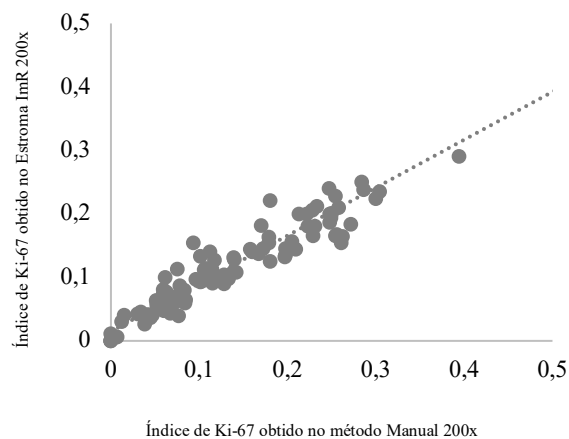


Gráfico 6 - Elevada correlação entre o índice de Ki-67 obtido no método Manual 200x e no Estroma ImR 200x.

Tabela 4 - Coeficientes de correlação do método Estroma ImR 200x com as metodologias ImR 200x e Manual 200x estratificados pelo tipo de tumor (Tumor mamário canino, Carcinoma mamário felino e Mastocitoma).

n	Correlações	Amostra	Metodologia	Estroma ImR 200X	Manual 200x
30	Rho de Spearman (r_s)	Tumor mamário canino	ImR 200x	0,935**	0,909**
62	Rho de Spearman (r_s)	Carcinoma mamário felino	ImR 200x	0,954**	0,947**
10	Rho de Spearman (r_s)	Mastocitoma	ImR 200x	0,979**	0,985**

** n=102; A correlação é significativa no nível 0,01 (2 extremidades).

Verifica-se na tabela acima que todas as correlações são classificadas como positivas, fortes e estatisticamente significativas ($P < 0,001$) (Tabela 4).

Os mastocitomas são a neoplasia que apresenta o coeficiente de correlação mais elevado entre o método ImR 200x sem estroma e o método ImR 200x com estroma ($r_s = 0,979$; $P < 0,001$), tal como entre o método Manual 200x e o método ImR 200x com estroma ($r_s = 0,985$; $P < 0,001$), seguindo-se os carcinomas mamários felinos e por fim os tumores mamários caninos.

3.3. Concordância entre as várias metodologias – ICC

Tabela 5 - Concordância entre o método Manual 200x e as metodologias ImR 200x e ImR 400x.

n	Metodologia	ICC (IC 95%)	F-value	P - value
102	ImR 200x	0,972 (0,959; 0,981)	70,641	< 0,001
102	ImR 400x	0,952 (0,930; 0,967)	40,747	< 0,001

Na Tabela 5 pode observar-se uma concordância quase perfeita ($> 0,80$) entre o método Manual 200x e as metodologias ImR 200x e ImR 400x, sendo que o valor de

concordância mais elevado é entre o método Manual 200x e o método ImR 200x (ICC=0,972; IC 95% 0,959; 0,981; P<0,001).

Tabela 6 - Concordância entre o método Manual 200x e as metodologias ImR 200x e ImR 400x estratificada pelo tipo de tumor (Tumor mamário canino, Carcinoma mamário felino e Mastocitoma).

n	Amostra	Metodologia	ICC (IC 95%)	F-value	P - value
30	Tumor mamário canino	ImR 200x	0,959 (0,916; 0,980)	47,998	< 0,001
		ImR 400x	0,933 (0,864; 0,967)	28,691	< 0,001
62	Carcinoma mamário felino	ImR 200x	0,975 (0,958; 0,985)	77,450	< 0,001
		ImR 400x	0,954 (0,924; 0,972)	42,195	< 0,001
10	Mastocitoma	ImR 200x	0,951 (0,817; 0,988)	40,029	< 0,001
		ImR 400x	0,916 (0,698; 0,978)	22,679	< 0,001

Verifica-se uma concordância quase perfeita (>0,80) entre o método Manual 200x e as metodologias ImR 200x e ImR 400x nas várias neoplasias em análise (Tabela 6).

Os carcinomas mamários felinos apresentam a maior concordância entre o método Manual 200x e o método ImR 200x (ICC=0,975; IC 95% 0,958; 0,985; P<0,001), seguindo-se os tumores mamários caninos (ICC=0,959; IC 95% 0,916; 0,980; P<0,001) e por fim os mastocitomas (ICC=0,951; IC 95% 0,817; 0,988; P<0,001).

Tabela 7 - Concordância entre o método Estroma ImR 200x e as metodologias ImR 200x e Manual 200x.

n	Metodologia	ICC (IC 95%)	F-value	P - value
102	ImR 200x	0,964 (0,948; 0,976)	55,138	< 0,001
102	Manual 200x	0,930 (0,898; 0,952)	27,582	< 0,001

Existe uma concordância quase perfeita ($>0,80$) entre o método ImR 200x sem estroma e o método ImR 200x com estroma (ICC=0,964; IC 95% 0,948; 0,976; $P<0,001$), tal como entre o método Manual 200x e o método ImR 200x com estroma (ICC=0,930; IC 95% 0,898; 0,952; $P<0,001$) (Tabela 7).

Tabela 8 - Concordância entre o método Estroma ImR 200x e as metodologias ImR 200x e Manual 200x estratificada pelo tipo de tumor (Tumor mamário canino, Carcinoma mamário felino e Mastocitoma).

n	Amostra	Metodologia	ICC (IC 95%)	F-value	P - value
30	Tumor mamário canino	ImR 200x	0,962 (0,921; 0,982)	51,414	$< 0,001$
		Manual 200x	0,937 (0,872; 0,969)	30,656	$< 0,001$
62	Carcinoma mamário felino	ImR 200x	0,961 (0,936; 0,976)	49,984	$< 0,001$
		Manual 200x	0,929 (0,884; 0,956)	27,015	$< 0,001$
10	Mastocitoma	ImR 200x	0,986 (0,946; 0,997)	145,560	$< 0,001$
		Manual 200x	0,958 (0,843; 0,990)	47,115	$< 0,001$

Na Tabela 8 pode verificar-se uma concordância quase perfeita ($>0,80$) entre os métodos com e sem estroma nos vários tipos de tumor em estudo, sendo que os mastocitomas apresentam o valor de concordância mais elevado, tanto entre o método ImR 200x sem estroma e o método ImR 200x com estroma (ICC=0,986; IC 95% 0,946; 0,997; $P<0,001$), como entre o método Manual 200x e o método ImR 200x com estroma (ICC=0,958; IC 95% 0,843; 0,990; $P<0,001$).

3.4. Concordância entre as várias contagens manuais de amostras homogêneas e heterogêneas– ICC

Tabela 9 - Concordância entre as diferentes contagens manuais de amostras homogêneas.

n	ICC (IC 95%)	F-value	P - value
6	0,509 (0,162; 0,883)	6,193	0,001

Na Tabela 9 verifica-se uma concordância moderada (0,41 e 0,60) entre as várias contagens manuais de cada amostra homogênea (ICC=0,509; IC 95% 0,162; 0,883; P=0,001).

Tabela 10 - Concordância entre as diferentes contagens manuais de amostras homogêneas estratificada pelo tipo de tumor.

n	Amostra	ICC (IC 95%)	F-value	P - value
4	Carcinoma mamário felino	-----	-----	-----
2	Mastocitoma	0,955 (0,723; 1,000)	106,495	< 0,001

No caso dos mastocitomas obteve-se uma concordância quase perfeita (>0,80) entre as várias contagens manuais de cada amostra (ICC=0,955; IC 95% 0,723; 1,000; P<0,001), sendo que no caso dos carcinomas mamários felinos não foi possível realizar o cálculo do ICC (Tabela 10).

Tabela 11 - Concordância entre as diferentes contagens manuais de amostras heterogêneas.

n	ICC (IC 95%)	F-value	P - value
12	0,558 (0,324; 0,805)	8,579	< 0,001

Verifica-se uma concordância moderada (0,41 e 0,60) entre as várias contagens manuais de cada amostra heterogénea (ICC=0,558; IC 95% 0,324; 0,805; P<0,001) (Tabela 11).

Tabela 12 - Concordância entre as diferentes contagens manuais de amostras heterogéneas estratificada pelo tipo de tumor.

n	Amostra	ICC (IC 95%)	F-value	P - value
5	Tumor mamário canino	0,669 (0,327; 0,949)	13,146	< 0,001
7	Carcinoma mamário felino	0,416 (0,129; 0,810)	5,276	0,001

Na Tabela 12, no caso dos tumores mamários caninos verifica-se uma concordância forte (0,61 a 0,80) entre as várias contagens manuais de cada amostra (ICC=0,669; IC 95% 0,327; 0,949; P<0,001) e no caso dos carcinomas mamários felinos observa-se uma concordância moderada (0,41 a 0,60) entre as várias contagens manuais de cada amostra (ICC=0,416; IC 95% 0,129; 0,810; P=0,001).

3.5. Concordância entre a média das contagens manuais a 200x e o método ImR 50x – ICC

Tabela 13 - Concordância entre a média das várias contagens manuais a 200x e o método ImR 50x.

n	ICC (IC 95%)	F-value	P - value
18	0,879 (0,706; 0,953)	15,528	< 0,001

Na Tabela 13 obteve-se uma concordância quase perfeita ($>0,80$) entre a média das várias contagens manuais a 200x e o método ImR 50x (ICC=0,879; IC 95% 0,706; 0,953; $P<0,001$).

Tabela 14 - Concordância entre a média das várias contagens manuais a 200x e o método ImR 50x estratificada pelo tipo de tumor (Tumor mamário canino, Carcinoma mamário felino e Mastocitoma).

n	Amostra	ICC (IC 95%)	F-value	P - value
5	Tumor mamário canino	0,841 (0,093; 0,982)	11,574	0,018
11	Carcinoma mamário felino	0,869 (0,586; 0,963)	14,232	$< 0,001$
2	Mastocitoma	0,999 (0,555; 1,000)	2262,418	0,013

Pode observar-se na Tabela 14 uma concordância quase perfeita ($>0,80$) entre a média das várias contagens manuais a 200x e o método ImR 50x nos vários tipos de tumor em estudo, sendo que o valor de concordância mais elevado entre estas metodologias foi obtido nos mastocitomas (ICC=0,999; IC 95% 0,555; 1,000; $P=0,013$).

IV. DISCUSSÃO

Está descrita a existência de uma relação entre a expressão da proteína Ki-67 e a proliferação celular (Abadie *et al.*, 1999), sendo que em Medicina Humana, o Ki-67 é o marcador de proliferação mais comumente utilizado em tumores mamários (Fitzgibbons *et al.*, 2000). Este é considerado um marcador útil e confiável na obtenção do prognóstico nestes tumores (Yerushalmi *et al.*, 2010; Dowsett *et al.*, 2011), uma vez que a sua expressão demonstrou ter uma correlação positiva com o tamanho do tumor, metastização, expressão de receptores nucleares de estrogénio, morte e baixa taxa de sobrevida (Bouzubar *et al.*, 1989; Brown & Gatter, 1990; Veronese & Gambacorta, 1992). Em Medicina Veterinária, a expressão de Ki-67 pelas células neoplásicas está significativamente associada ao prognóstico de alguns tumores (Peña *et al.*, 1998; Maglennon *et al.*, 2008), nomeadamente, em mastocitomas (Abadie *et al.*, 1999; Scase *et al.*, 2006; Webster *et al.*, 2007; Maglennon *et al.*, 2008), tumores mamários caninos (Penã *et al.*, 1998; Alenza *et al.*, 2000; Nieto *et al.*, 2000) e carcinomas mamários felinos (Castagnaro *et al.*, 1998b; Soares *et al.*, 2016), os quais foram abordados no presente estudo.

O presente estudo teve como objetivo validar a contagem do índice de Ki-67 através da análise automatizada (ImmunoRatio) de tumores mamários caninos, carcinomas mamários felinos e mastocitomas e comparar os resultados obtidos com os resultados da contagem manual.

O *International Ki67 in Breast Cancer Working Group* recomenda a utilização da contagem manual (preferencialmente de pelo menos 1000 células, sendo o mínimo absoluto 500 células) para a obtenção do índice de Ki-67, no entanto refere que não está estabelecida a superioridade deste método relativamente aos métodos de análise de imagem automatizados (Dowsett *et al.*, 2011). A contagem manual para contabilização do índice de Ki-67 apresenta algumas limitações, por se tratar de um método moroso e pouco prático (Tuominen *et al.*, 2010; Zhong *et al.*, 2016), sendo que alguns estudos referem que o valor de Ki-67 pode ser influenciado pela variação intra-observador e inter-observador (Mikami *et al.*, 2013; Polley *et al.*, 2013; Vörös *et al.*, 2013; Vörös *et al.*, 2014). Em Medicina Humana vários autores reportam a análise automatizada do Ki-67 como uma alternativa atrativa à contagem manual (Tuominen *et al.*, 2010; Fasanella *et al.*, 2011; Konsti *et al.*, 2011; Mohammed *et al.*, 2012; Klauschen *et al.*, 2015; Fulawka & Halon, 2016; Zhong *et al.*, 2016; Yeo *et al.*, 2017), sendo que no presente estudo, para a realização da análise automatizada, se utilizou o ImmunoRatio.

O ImmunoRatio foi desenvolvido como um *plug-in* (disponível online de forma gratuita) para o *software* de análise de imagem ImageJ e é utilizado como um auxiliar de diagnóstico dirigido a técnicos treinados para avaliar amostras imunocoradas (Tuominen *et al.*, 2010). A escolha do ImmunoRatio para a realização da análise automatizada do presente estudo, baseou-se no facto deste *plug-in* estar disponível online, ser de fácil acesso, ser de simples utilização e de estar descrita a sua aplicação em estudos semelhantes em Medicina Humana (Tuominen *et al.*, 2010; Yeo *et al.* 2017).

No presente estudo todas as amostras foram submetidas a IHQ, sendo que o anticorpo utilizado nas amostras de carcinoma mamário felino foi o Ki-67 *Rabbit Polyclonal Antibody* (Thermo Scientific) e o anticorpo utilizado nas amostras de mastocitomas e de tumores mamários caninos foi o Ki-67 (SP6) *rabbit monoclonal anti-human* (Cell Marque™). O *International Ki67 in Breast Cancer Working Group* definiu a IHQ como o método de eleição para contabilizar e monitorizar a proliferação tumoral e considera como *gold standard* o anticorpo monoclonal MIB-1 (Dowsett *et al.*, 2011). Ainda assim, o grupo sugere a comparação da utilização deste anticorpo com outros anticorpos e com outros métodos de análise de proliferação (Dowsett *et al.*, 2011), uma vez que está descrito que a utilização de outros anticorpos anti Ki-67 pode ter vantagens adicionais (Wong *et al.*, 2007; Zabaglo *et al.*, 2010). Por exemplo, encontra-se descrito que o anticorpo Ki-67 (SP6) *rabbit monoclonal anti-human*, utilizado neste estudo, reconhece o mesmo epítopo Ki-67 repetido que o MIB-1 e pode providenciar uma maior sensibilidade (Wong *et al.*, 2007) e melhorar a análise quantitativa de imagem (Zabaglo *et al.*, 2010), pelo que a utilização deste anticorpo foi descrita com sucesso nos estudos de Cheang *et al.* (2009) e Niu *et al.* (2010). Também se encontra descrita a aplicação do anticorpo Ki-67 *Rabbit Polyclonal Antibody*, utilizado no presente estudo, no estudo de Soares *et al.* (2016), o qual pretendeu validar a utilização do índice de Ki-67 como marcador de prognóstico em gatas com carcinoma mamário e estabelecer um valor de *cutoff* para o índice de Ki-67. Tal como a contagem manual, o método de IHQ também apresenta algumas limitações, uma vez que não existe um método validado que permita a sistematização do procedimento. Dois estudos identificaram que alguns fatores pré-analíticos podem diminuir o índice de Ki-67, nomeadamente, o atraso na fixação, a congelação antes da fixação, a utilização de etanol ou solução de Bouin em vez de fixação com formalina neutra tamponada, e a utilização de protocolos com EDTA ou com descalcificação ácida (Benini *et al.*, 1997; Mengel *et al.*, 2002). Assim sendo, o *International Ki67 in Breast Cancer Working Group* propôs *guidelines* para analisar, interpretar e reportar o

índice de Ki-67 de modo a reduzir a variabilidade inter-laboratório e melhorar a comparabilidade de resultados inter-estudos (Dowsett *et al.*, 2011).

No estudo de Zhong *et al.* (2016), realizado em Medicina Humana, com o objetivo de comparar a contagem manual com a análise automatizada na contabilização do índice de Ki-67 em Cancro da Mama na mulher, foram selecionados pelo menos 3 campos aleatórios com uma ampliação de 400x no caso de amostras homogéneas e 3 campos aleatórios e 3 *hotspots* com uma ampliação de 400x no caso de amostras heterogéneas. Com base no estudo acima referido, no presente estudo foram selecionados 5 campos aleatórios com uma ampliação de 200x no caso de amostras homogéneas e 3 campos aleatórios e 3 *hotspots* com uma ampliação de 200x no caso de amostras heterogéneas. No presente estudo optou-se por analisar campos com uma ampliação menor (200x), uma vez que esta ampliação, para além de abranger um maior número de células por campo, tornando cada imagem mais representativa da amostra, é a ampliação considerada ótima para a análise automatizada no ImmunoRatio pelos autores do *plug-in* (Tuominen *et al.*, 2010). Os autores do *plug-in* exigem a média de pelo menos 3 imagens por amostra, tal como na contagem manual o *International Ki67 in Breast Cancer Working Group* recomenda a contagem de pelo menos 3 campos para estabelecer um índice de Ki-67 representativo, no entanto com uma ampliação de 400x.

No presente estudo, como o principal objetivo foi verificar e validar a utilização do *plug-in* ImmunoRatio para contabilização do índice de Ki-67 e não estabelecer um prognóstico aos animais dos quais foram recolhidas as amostras, as imagens obtidas da amostra presente na lâmina digitalizada (5 imagens nos tumores homogéneos e 6 imagens nos tumores heterogéneos) foram analisadas de forma individual (n=102). No entanto, considera-se que no futuro seria interessante a realização de um estudo semelhante, com uma amostra maior, de modo a verificar se a média do índice de Ki-67 das imagens de cada amostra obtido pela contagem manual teria um valor prognóstico idêntico à média do índice de Ki-67 das imagens de cada amostra obtido pelo ImmunoRatio. A média dos índices de Ki-67 das várias imagens de cada amostra obtidos por contagem manual, apenas foi realizada com o intuito desta ser comparada com o resultado do índice de Ki-67 obtido através do ImmunoRatio numa só imagem a 50x, uma vez que a esta ampliação se pode visualizar e analisar uma grande parte da amostra presente na lâmina digitalizada.

O presente estudo obteve uma correlação positiva, forte e estatisticamente significativa entre o índice de Ki-67 obtido através do método Manual 200x e o índice de Ki-67 obtido através do ImmunoRatio a uma ampliação de 200x ($r_s=0,973$; $P<0,001$) e 400x

($r_s=0,942$; $P<0,001$), ou seja, os valores obtidos nos diferentes métodos, variaram no mesmo sentido. À semelhança destes resultados verificou-se uma concordância quase perfeita ($ICC>0,80$) entre o método manual e as outras metodologias, o que significa que as várias metodologias permitiram aferir resultados idênticos. De acordo com o esperado, a metodologia que apresenta a correlação mais forte e o valor de concordância mais elevado com o método Manual 200x é o ImR 200x, no entanto a correlação e a concordância entre método Manual 200x e o ImR 400x também é muito elevada, evidenciando que, neste estudo, uma imagem com uma ampliação de 400x no ImmunoRatio pode ser representativa de uma área analisada por contagem manual com ampliação de 200x. Assim sendo, à semelhança dos estudos de Tuominen *et al.* (2010) e de Yeo *et al.* (2017), os quais compararam a contagem manual com o *software* ImmunoRatio na obtenção do índice de Ki-67 no cancro da mama na mulher, verifica-se uma excelente correlação e concordância entre o método manual e o ImmunoRatio. Existem vários estudos em Medicina Humana semelhantes ao estudo Yeo *et al.* (2017), os quais reportam com sucesso a análise automatizada face à contagem manual, no entanto utilizam outros *softwares* de análise de imagem (Fasanella *et al.*, 2011; Konsti *et al.*, 2011; Mohammed *et al.*, 2012; Klauschen *et al.*, 2015; Fulawka & Halon, 2016; Zhong *et al.*, 2016).

Na análise estratificada pelo tipo de tumor, os resultados entre o método Manual 200x e o método ImR a uma ampliação de 200x e 400x seguiram a tendência verificada na análise global, ou seja, todas as correlações foram positivas, fortes e estatisticamente significativas ($P<0,001$) e todos os valores de ICC foram quase perfeitos. Embora os mastocitomas tenham apresentado valor de concordância ligeiramente mais baixo na análise estratificada pelo tipo de tumor, o valor de ICC obtido foi igualmente promissor, no entanto é preciso ter em conta a impossibilidade do ImmunoRatio em diferenciar eosinófilos e mastócitos, o que se pode refletir numa redução do índice de Ki-67. A elevada concordância entre o ImmunoRatio e a contagem manual nos mastocitomas poderá estar assim enviesada devido à contagem de eosinófilos pelo *plug-in* e pelo próprio operador na contagem manual, uma vez que a contagem manual foi realizada com uma ampliação de 200x, o que dificultou também a distinção dos eosinófilos. Assim sendo, de modo a evitar a redução do índice de Ki-67 associada à contagem dos eosinófilos, seria interessante a realização de uma macro no ImageJ que permitisse a distinção entre eosinófilos e mastócitos tendo em conta o tamanho e a forma dos núcleos, uma vez que tal como referido por Yeo *et al.* (2017), o ImmunoRatio, ao

contrário de outros programas de software de análise de imagens comerciais, não consegue distinguir as células tumorais das células normais através do tamanho.

No presente estudo, tal como num estudo de Medicina Humana de Yeo *et al.* (2017), o estroma foi removido nas imagens submetidas à metodologia ImR 200x e ImR 400x, de maneira a evitar que as células estromais influenciassem o valor final do índice de Ki-67, uma vez que o estudo de Sundara Rajan *et al.* (2013) demonstrou uma concordância moderada entre a contagem manual e a análise automatizada devido à falta de especificidade do algoritmo na diferenciação entre núcleos de células tumorais e não tumorais. A contagem manual tem como vantagem a capacidade do operador em distinguir células tumorais de células estromais na amostra comparativamente com o algoritmo de análise de imagem (Konsti *et al.*, 2011), o que explica o facto da média do índice de Ki-67 obtido através da metodologia ImR 200x com estroma ser inferior à média do índice de Ki-67 obtido pelo método manual nos vários tipos de tumores. Ainda assim, no presente estudo, tanto na análise global como na análise estratificada pelo tipo de tumor, obteve-se uma correlação forte, positiva e estatisticamente significativa e uma concordância quase perfeita entre o método ImR 200x sem estroma e o método ImR 200x com estroma, tal como entre o método Manual 200x e o método ImR 200x com estroma. Assim sendo, a eliminação das células estromais não influenciou demarcadamente os resultados entre os métodos avaliados, ou seja, os valores de correlação e concordância apesar de serem mais elevados entre o método Manual 200x e o método ImR 200x sem estroma, foram também elevados entre estes métodos e o método ImR 200x com estroma.

Na análise estratificada pelo tipo de tumor, os mastocitomas foram o tumor que apresentou os valores mais elevados de correlação e concordância, tanto entre o método ImR 200x sem estroma e o método ImR 200x com estroma ($r_s=0,979$; $P<0,001$; $ICC=0,986$; IC 95% 0,946; 0,997; $P<0,001$), como entre o método manual 200x e o método ImR 200x com estroma ($r_s=0,985$; $P<0,001$; $ICC=0,958$; IC 95% 0,843; 0,990; $P<0,001$), o que pode ser justificado pelo facto dos mastocitomas serem o tumor mais homogéneo entre os tumores em análise.

A concordância obtida entre o ImR 200x sem estroma e o ImR 200x com estroma foi mais elevada do que a concordância obtida entre o método Manual 200x e o ImR 200x com estroma em todos os tipos de tumor. Esta situação pode ser justificada pelo facto do índice de Ki-67 ser mais reduzido em ambas as metodologias automatizadas em comparação à metodologia manual, uma vez que no método ImR 200x sem estroma, os núcleos Ki-67

positivos fracamente corados podem não ter sido considerados devido ao valor de *threshold* selecionado, reduzindo erradamente o índice de Ki-67 e no método ImR 200x com estroma, para além da não contabilização de núcleos Ki-67 positivos fracamente corados, acresce o facto de ao não se eliminar o estroma, não se eliminarem células que poderão ser consideradas Ki-67 negativas, reduzindo também o índice de Ki-67. Assim sendo, tal como esperado, nos carcinomas mamários felinos e nos mastocitomas a média do índice de Ki-67 obtido através da metodologia ImR 200x com estroma foi inferior à média do índice de Ki-67 obtido através da metodologia manual 200x e da metodologia ImR 200x sem estroma. Contrariamente ao esperado, no caso dos tumores mamários caninos, a média do índice de Ki-67 obtido através da metodologia ImR 200x com estroma foi superior à média do índice de Ki-67 obtido através da metodologia ImR 200x sem estroma. Este resultado pode ser justificado pela possível contabilização errada de células Ki-67 positivas ao nível do estroma, o qual não foi eliminado na metodologia Estroma ImR 200x.

Nas amostras homogéneas obteve-se uma concordância moderada entre as várias contagens manuais (ICC=0,509; IC 95% 0,162; 0,883; P=0,001), uma vez que na análise estratificada pelo tipo de tumor, embora os mastocitomas tenham apresentado uma concordância quase perfeita (ICC=0,955; IC 95% 0,723; 1,000; P<0,001), não foi possível realizar o cálculo da concordância nos carcinomas mamários felinos. O erro obtido entre as várias contagens manuais dos carcinomas mamários felinos poderá ter ocorrido devido ao facto dos valores entre as imagens da mesma amostra terem uma diferença maior entre si do que os valores obtidos entre as imagens de amostras diferentes, estando este erro assim, associado ao facto destas amostras terem sido consideradas homogéneas de forma errada. Assim sendo, todas as amostras de carcinoma mamário felino deveriam ter sido consideradas amostras heterogéneas, ou seja, nas 4 amostras em que foram considerados 5 campos aleatórios, deveriam ter sido considerados 3 campos aleatórios e 3 campos *hotspot*, uma vez que, tal como referido por Dowsett *et al.* (2011), uma amostra aparentemente homogénea pode apresentar *hotspots*. O resultado de concordância obtido entre as várias contagens manuais no caso dos mastocitomas (n=2), nos quais foram selecionados 5 campos aleatórios a 200x (cada campo com pelo menos 500 células) sugere que, neste caso, o valor do índice de Ki-67 obtido a partir de uma imagem aleatória a 200x (com pelo menos 500 células) seria representativo do valor do índice de Ki-67 da amostra. Ainda assim, é importante salientar a necessidade da realização de investigações futuras de forma a verificar este resultado, uma vez que no presente estudo a amostra de mastocitomas é bastante reduzida.

Nas amostras heterogêneas obteve-se uma concordância moderada entre as várias contagens manuais (ICC=0,558; IC 95% 0,324; 0,805; P<0,001), sendo que na análise estratificada pelo tipo de tumor, os tumores mamários caninos apresentaram uma concordância forte (ICC=0,669; IC 95% 0,327; 0,949; P<0,001) e os carcinomas mamários felinos apresentaram uma concordância moderada (ICC=0,416; IC 95% 0,129; 0,810; P=0,001). A diminuição dos valores da concordância entre as várias contagens manuais no caso dos tumores heterogêneos relativamente aos tumores homogêneos era de esperar, uma vez que a existência de zonas *hotspot* e zonas não *hotspot* leva à variação dos índices de Ki-67 entre as várias imagens obtidas a partir da mesma amostra. Este resultado evidencia a necessidade da contabilização do índice tendo em conta zonas *hotspot* quando estas estão presentes, permitindo assim uma abordagem que avalie o *score* médio geral da amostra, tal como referido por Dowsett *et al.* (2011).

No presente estudo obteve-se uma concordância quase perfeita entre o valor médio das contagens manuais e o ImR 50x, tanto na análise global como na análise estratificada pelo tipo de tumor. Estes resultados sugerem que a utilização do *plug-in* ImmunoRatio em fotografias de menor ampliação (50x) é viável e representativa do índice de Ki-67 obtido pela média das contagens manuais. O valor de concordância mais elevado foi obtido nos mastocitomas (ICC=0,999; IC 95% 0,555; 1,000; P=0,013), seguindo-se o carcinoma mamário felino (ICC=0,869; IC 95% 0,586; 0,963; P<0,001) e por fim o tumor mamário canino (ICC=0,841; IC 95% 0,093; 0,982; P=0,018). Este resultado está de acordo com o previsto, uma vez que sendo o mastocitoma o tumor mais homogêneo, era de esperar que a média dos valores de Ki-67 obtidos nos vários campos selecionados para a realização da contagem manual se aproximassem mais do valor de Ki-67 obtido pelo ImR a uma ampliação de 50x, na qual se pode visualizar e analisar uma grande parte da amostra presente na lâmina digitalizada.

A média do índice de Ki-67 obtido através do ImR 200x foi inferior à média do índice de Ki-67 obtido através do método manual 200x em todos os tipos de tumor, tal como no estudo de Yeo *et al.* (2017). Este resultado poderá estar relacionado com a presença de núcleos Ki-67 positivos fracamente corados, os quais foram contabilizados na contagem manual, mas não foram considerados na análise automatizada devido ao valor de *threshold* selecionado. Ainda assim, o ajuste cuidadoso do *threshold* de azul e castanho nas diferentes amostras, no modo avançado do ImmunoRatio, foi importante para minimizar esta limitação e tornar o resultado o mais fidedigno possível. A média da variação entre os valores de índice

de Ki-67 obtidos pelo ImmunoRatio e pelo método manual foi de $1,4\% \pm 1,4\%$ nos tumores mamários caninos, de $2,4\% \pm 1,8\%$ nos carcinomas mamários felinos e $0,7\% \pm 0,8\%$ nos mastocitomas. Assim sendo, sugere-se a realização da contagem manual quando os valores de Ki-67 obtidos pelo ImmunoRatio se encontrem dentro do respetivo intervalo em relação ao valor de *cutoff*.

Um estudo realizado em Cancro da Mama em mulheres recomenda a coloração IHQ dupla como uma alternativa para contornar as limitações da coloração simples e melhorar a precisão da análise automatizada (Nielsen *et al.*, 2014). Nielsen *et al.* (2014) refere que a utilização combinada do marcador Ki-67 com um marcador epitelial (ex: citoqueratina Pan – clone KL1) pode facilitar e melhorar a distinção entre células Ki-67 positivas e negativas. Assim sendo, Nielsen *et al.* (2014) verificaram a redução acentuada do índice de Ki-67 aquando a utilização de coloração dupla, devido à interpretação de células proliferativas, linfócitos e células estromais, como células tumorais na coloração simples. Os autores referem ainda que a coloração IHQ dupla permite o destaque das células Ki-67 negativas, as quais devido à baixa intensidade de coloração podem ser subestimadas com a coloração simples, refletindo-se também na elevação do índice de Ki-67 (Nielsen *et al.*, 2014).

Vários estudos em Medicina Humana, nos quais se utilizou coloração simples, obtiveram resultados promissores na utilização da análise automatizada para obtenção do índice de Ki-67 (Tuominen *et al.*, 2010; Fasanella *et al.*, 2011; Konsti *et al.*, 2011; Mohammed *et al.*, 2012; Klauschen *et al.*, 2015; Fulawka & Halon, 2016; Zhong *et al.*, 2016; Yeo *et al.*, 2017), no entanto seria interessante a realização de estudos semelhantes, mas recorrendo a coloração IHQ dupla, uma vez que Nielsen *et al.* (2014) referem que esta coloração pode aumentar a precisão do índice, devido à melhor distinção das células proliferativas. Embora a coloração IHQ dupla pareça ser uma via interessante para melhorar a precisão da análise automatizada, esta não seria uma alternativa viável no ImmunoRatio, uma vez que o programa foi desenvolvido com o intuito de reconhecer a marcação DAB e hematoxilina. Dado que a qualidade da coloração é essencial para uma boa análise de imagem automatizada, no futuro, seria também interessante a uniformização dos protocolos de coloração IHQ, de modo a sistematizar o procedimento, reduzindo as variações inter e intra-laboratório, permitindo assim, uma comparação mais fidedigna dos resultados de diferentes estudos.

Apesar de todos os estudos referidos serem em amostras de Cancro da Mama na mulher, seria interessante a sua realização a nível da Medicina Veterinária nos diferentes tipos

histológicos de tumores em que o Ki-67 é considerado fator de prognóstico. É ainda importante salientar que apesar do presente estudo se assemelhar aos vários estudos acima referidos, existem vários *softwares* de análise de imagem automatizada e apenas alguns estudos utilizaram o ImmunoRatio.

V. CONCLUSÃO

Com o presente estudo pode concluir-se que o ImmunoRatio pode ser uma alternativa viável e rápida à contagem manual, a qual se trata de um método moroso e pouco prático. A análise realizada sugere ainda que tanto se podem usar imagens com ampliação de 200x como de 400x e que a remoção prévia do estroma não influencia demarcadamente o índice de Ki-67, no entanto considera-se necessária a realização de mais estudos em Medicina Veterinária.

No presente estudo verificou-se ainda uma elevada concordância entre as várias contagens manuais dos mastocitomas (tumor homogéneo), sugerindo que um campo com uma ampliação de 200x (≈ 1000 células) representa a amostra, no entanto a concordância obtida no caso dos tumores heterogéneos evidenciou a importância da inclusão de zonas *hotspot* na contabilização do índice de Ki-67.

Por fim, demonstrou-se a capacidade do ImmunoRatio na contabilização do índice de Ki-67 em imagens a baixas ampliações (50x), dado que se observou uma elevada concordância entre a média das várias contagens manuais de cada amostra e o ImmunoRatio a uma ampliação de 50x, na qual se pode visualizar e analisar uma grande parte da amostra presente na lâmina digitalizada.

De modo a validar os resultados obtidos, sugere-se a realização de mais estudos da mesma natureza em Medicina Veterinária, no entanto que incluam uma amostra maior e um maior número de operadores, tanto na contabilização do índice de Ki-67 através da contagem manual como da análise automatizada.

Apesar das limitações acima referidas, considera-se o presente trabalho interessante, dado que se trata de um estudo pioneiro em Medicina Veterinária que compara o índice de Ki-67 obtido pela contagem manual com o índice de Ki-67 obtido através de análise automatizada (ImmunoRatio).

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abadie, J.J., Amardeilh, M.A., Delverdier, M.E. (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: 1629–1634.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.(2008). *The Cell Cycle in: Molecular Biology of the Cell* 5th ed. New York: Garland Science, pp.1053-1092.

Al-Janabi, S., van Slooten, H.J., Visser, M., van der Ploeg, T., van Diest, P.J., Jiwa M. (2013). Evaluation of mitotic activity index in breast cancer using whole slide digital images. *PLoS ONE*, 8:e82576.

Aranda, F.I., Laforga, I.B. (1997). Cellular proliferation in breast ductal infiltrating carcinoma. Correlation with clinical and histopathological variables. *Pathol. Res. Pract.*, v.193, p.683-688.

Argyle, D.J., Khanna, C. (2013). Tumor Biology and Metastasis in: Withrow S.J. and Vail D.M. (eds). *Small animal clinical oncology*. 4th ed. St Louis, MO: Saunders, pp. 30-31.

Aubele, M., Biesterfeld, S., Derenzini, M., Hufnagl, P., Martin, H., Ofner, D., *et al.* (1994). Guidelines of AgNOR quantitation: Committee on AgNOR Quantitation within the European Society of Pathology. *Zentralbl Pathol*, 140: 107–108.

Benini, E., Rao, S., Daidone, M.G., Pilotti, S., Silvestrini, R. (1997). Immunoreactivity to MIB-1 in breast cancer: methodological assessment and comparison with other proliferation indices. *Cell Prolif*, 30(3–4):107–115.

Beresford, M.J., Wilson, G.D., Makris A. (2006). Measuring proliferation in breast cancer: practicalities and applications. *Breast Cancer Res*, 8: 216.

Berlato, D., Murphy, S., Monti, P., Stewart, J., Newton, J.R., Flindall, A., *et al.* (2013). Comparison of mitotic index and Ki67 index in the prognostication of canine cutaneous mast cell tumours. *Vet Comp Oncol*, 13:143–150. doi: 10.1111/vco.12029.

Bishop, J.M. (1987). The molecular genetics of cancer. *Science*.235:305- 11.

Blackwood L., Murphy S., Buracco P., De Vos J.P., De Fornel-Thibaud P., Hirschberger J., *et al.* (2012). European consensus documents on Mast Cell Tumours in dogs and cats. *Vet. Comp. Oncol.* 10:e1-e29.

Bologna-Molina, R., Mosqueda-Taylor, A., Molina-Frechero, N., Mori-Estevez, A.D., Sanchez-Acuna, G. (2013). Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 18:e174–9.10.

Bostock, D.E. (1973). The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs, *J Small Anim Pract* 14:27-41.

Bostock, D.E. (1979). Prognosis after surgical excision of canine melanomas. *Vet. Pathol*, 16:32–40.

Bostock, D.E., Dye, M.T. (1980). Prognosis after surgical excision of canine fibrous connective tissue sarcomas. *Vet Pathol*, 17:581–588.

Bostock, D.E. (1986a). Canine and feline mammary neoplasms. *Br Vet J*, 142:506–515.

Bostock, D.E. (1986b). Neoplasms of the skin and subcutaneous tissues in dogs and cats. *Br Vet J*, 142:1–19.

Bostock, D.E., Crocker, J., Harris, K., Smith, P. (1989). Nucleolar organiser regions as indicators of post-surgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumours. *Br J Cancer*, 59: 915–8.

Brodey, R.S. (1970). Canine and feline neoplasia, *Adv Vet Sci Comp Med* 14:309-354.

Bouzubar, N., Walker, K.J., Griffiths, K., Ellis, I.O., Elston, C.W., Robertson, J.F., *et al.* (1989). Ki67 immunostain- ing in primary breast cancer: pathological and clinical associations. *Br J Cancer*, 59:943-947.

Brown, D.C., Gatter, K.C. (1990). Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology*, 17:489-503.

Bruno, S., Darzynkiewicz, Z. (1992). Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL- 60 cell. *Cell Prolif.* 25(1):31-40.

Burrai, G.P., Mohammed, S.I., Miller, M.A., Marras, V., Pirino, S., Addis, M.F., *et al.* (2010). Spontaneous feline mammary intraepithelial lesions as a model for human estrogen receptor- and progesterone receptor-negative breast lesions. *BMC Cancer*, 10:156.

Carvalho, M.I., Pires, I., Prada, J., Lobo, L., Queiroga, F.L. (2016). Ki-67 and PCNA expression in canine mammary tumors and adjacent nonneoplastic mammary glands: prognostic impact by a multivariate survival analysis. *Vet Pathol*, 53:1138–1146.

Castagnaro, M., Casalone, C., Ru, G., Nervi, G.C., Bozzetta, E., Caramelli, M. (1998a). Argyrophilic nucleolar organiser regions (AgNORs) count as indicator of post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. *Res Vet Sci* 64:97–100.

Castagnaro, M., De Maria, R., Bozzetta, E., Ru, G., Casalone, C., Biolatti, B., *et al.* (1998b). Ki-67 index as indicator of the post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. *Res Vet Sci*, 65(3):223–226.

Cheang, M.C., Chia, S.K., Voduc, D., Gao, D., Leung, S., Snider, J., *et al.* (2009). Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 101:736–750.

Collins, T.J. (2007). ImageJ for microscopy. *Biotechniques*. 43(1) Suppl:25–30.

De Las Mulas, J., Millán, Y., Dios, R. (2005). A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor α and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the Dog. *Vet Pathol*, 42:200–212.

De Oliveira, M.G., Lauxen Ida, S., Chaves, A.C., Rados, P.V., Sant'AnaFilho, M. (2008). Immunohistochemical analysis of the patterns of p53 and PCNA expression in odontogenic cystic lesions. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 13:E275-80.

Destexhe, E., Vanmanshoven, P., Coignoul, F. (1995). Comparison of argyrophilic nucleolar organizer regions by counting and image analysis in canine mammary tumors. *Am J Vet Res*, 56:185–187.

De Vico, G., Maiolino, P., Restucci, P. (1995). Silver-stained nucleolar (AgNOR) cluster size in feline mammary carcinomas: lack of correlation with histological appearance, mitotic activity, tumour stage, and degree of nuclear atypia. *J Comp Pathol* 113: 69 –73.

Dorn, C.R., Taylor, D.O., Schneider, R., Hibbard, H.H., Klauber, M.R. (1968). Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County, *J Natl Cancer Inst* 40:307–318.

Downing, S., Chien, M.B., Kass, P.H., Moore, P.E., London, C.A. (2002). Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of c-kit in mast cell tumors of dogs. *Am J Vet Res*, 63(12):1718–1723.

Dowsett, M., Nielsen, T.O., A'Hern, R., Bartlett, J., Coombes, R. C., Cuzick J., *et al* (2011). Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the international Ki67 in Breast Cancer Working Group. *J Natl Cancer Inst.*, 103:1656–1664.

Dutra, A.P., Azevedo Júnior, G.M., Schmitt, F.C., & Cassali, G.D.. (2008). Assessment of cell proliferation and prognostic factors in canine mammary gland tumors. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 60(6), 1403-1412.

Egenvall, A., Bonnett, B.N., 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* 69:109– 127.

- Egenvall, A., Bonnett, B.N., Haggstrom, J., Ström Holst, B., Möller, L., Nødtvedt, A. (2010). Morbidity of insured Swedish cats during 1999-2006 by age, breed, sex, and diagnosis. *J Feline Med Surg* 12:948–959.
- Elston, C.W., Ellis, I.O. (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, v.19, p.403-410.
- Elston, L. B., Sueiro, F. A., Cavalcanti, J. N., *et al.* (2009). The importance of the mitotic index as a prognostic factor for survival of canine cutaneous mast cell tumors: a validation study. *Veterinary Pathology* 46, 362-364, (author reply 364-365)
- Fasanella, S., Leonardi, E., Cantaloni, C., Eccher, C., Bazzanella, I., Aldovini, D., *et al.* (2011). Proliferative activity in human breast cancer: Ki-67 automated evaluation and the influence of different Ki-67 equivalent antibodies. *Diagn Pathol*, 6 (suppl 1):S7.
- Ferguson P. (2013). Fast, free and reproducible: how to count KI-67 on your computer. *Pathology*, 45:S61.
- Ferreira, E., Bertagnolli, A.C., Cavalcanti, M.F., Schmitt, F.C., Cassali, G.D. (2009). The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. *Vet Comp Oncol*, 7:230–235.
- Ferreira, T., & Rasband, W. (2012). User Guide 1.46 revised edition. Acedido em 26/05/2018 em <http://imagej.nih.gov/ij>.
- Finnie, J.W., Bostock, D.E. (1979). Skin neoplasia in dogs, *Aust Vet J* 55:602-604.
- Fitzgibbons, P.L., Page, D.L., Weaver, D., Thor, A. D., Allred D. C., Clark G. M., *et al.* (2000). Prognostic factors in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*, 124:966–78.
- Fleiss JL, Cohen J. The equivalence of weighted kappa and the intraclass correlation coefficient as measures of reliability. *Educ Psychol Meas.* 1973; 33(3): 613–619.
- Fulawka, L., Halon, A. (2016) Proliferation Index Evaluation in Breast Cancer Using ImageJ and ImmunoRatio Applications. *Anticancer Res*, 36:3965-72.

- Funakoshi, Y., Nakayama, H., Uetsuka, K., Nishimura, R., Sasaki, N., Doi, K. (2000). Cellular proliferative and telomerase activity in canine mammary gland tumours. *Vet Pathol* 37:177–183.
- Gama, A., Alves, A., Schmitt, F. (2008). Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Arch*, 453:123–132.
- Garrett, L. D. (2014). Canine mast cell tumors: diagnosis, treatment, and prognosis. *Veterinary Medicine. Research and Reports*, 5: 49-58.
- Geraldes, M., Gärtner, F., Schmitt, F. (2000). Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumors. *Vet. Rec.* 146, 403-406.
- Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H., Stein, H. (1983). Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*, 31:13-20.
- Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H.H., Schwab, U., Stein, H. (1984) Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J. Immunol.* 133: 1710–1715.
- Gilbertson, S.R., Kurzman, I.D., Zachrau, R.E., Hurvitz, A.I., Black, M.M. (1983). Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Vet Pathol*, 20 (2): 127–142.
- Ginn, P.E., Mansell, J.E.K.L., Rakich, P.M. (2007). Skin and appendages. In: Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals. (Maxie, E.G., Ed.). Elsevier, Saunders. Fifth edition. pp. 553-781.
- Graves, G., Bjorling, D., Mahaffey, E. (1988). Canine hemangiopericytoma: 23 cases (1967-1984) *J. Am. Vet. Med. Assoc*, 192:99–102.

Hahn, K.A., Adams, W.H. (1977). Feline mammary neoplasia: biological behavior, diagnosis, and treatment alternatives. *Feline Pract*, 25:5–11.

Hahn, K.A., Bravo, L., Avenelli, J.S. (1994). Feline breast carcinoma as a pathologic and therapeutic model for human breast cancer. *In Vivo*, 8:825–828.

Hayden, D.W., Nielsen, S.W. (1971). Feline mammary tumours, *J Small Anim Pract* 12:687–698.

Hayden, D.W., Barnes, D.M., Johnson, K.H. (1989). Morphologic changes in the mammary gland of megestrol acetate-treated and untreated cats: a retrospective study. *Vet Pathol*, 26:104–113.

Hellmén, E., Bergstrom, R., Holmberg, L., Spangberg, I.B., Hansson, K., Lindgren, A. (1993). Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. *Vet Pathol*, 30:20–27.

Hsu, W., Huang, H., Liao, J., Wong, M., Chang, S. (2009). Increased survival in dogs with malignant mammary tumours overexpressing HER-2 protein and detection of a silent single nucleotide polymorphism in the canine HER-2 gene. *The Vet Journal*, 180:116–123.

Huang, W.Y., Coltrera, M., Schubert, M., Morton, T., Truelove, E. (1994). Histopathologic evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PC10) in oral epithelial hyperplasias and premalignant lesions. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod*, 78(6):748-754.

Ihmann, T., Liu, J., Schwabe, W., Häusler, P., Behnke, D., Bruch, H.P. (2004). High-level mRNA quantification of proliferation marker pKi-67 is correlated with favorable prognosis in colorectal carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 130:749–56.

Jannink, I., van Diest, P.J., Baak, J.P. (1995). Comparison of the prognostic value of four methods to assess mitotic activity in 186 invasive breast cancer patients: classical and random mitotic activity assessments with correction for volume percentage of epithelium. *Hum Pathol*, 26: 1086-1092.

Johnson, G.C., Miller, M.A., Ramos-Vara, J.A. (1995). Comparison of argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) and mitotic index in distinguishing benign from malignant canine smooth muscle tumors and in separating inflammatory hyperplasia from neoplastic lesions of the urinary bladder mucosa. *J Vet Diagn Invest*, 7:127–136.

Karayannopoulou, M., Kaldrymidou, E., Constantinidis, T.C., Dessiris, A. (2005). Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. *J Comp Pathol*, 133:1–7.

Keshgegian, A.A., Cnaan, A. (1995). Proliferation markers in breast carcinoma Mitotic figure count, S-phase fraction, proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 and MIB-1. *Am J Clin Pathol*, 104(1):42–49.

Kiupel, M., Teske, E., Bostock, D. (1999). Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. *Vet Pathol*, 36:292–300.

Kiupel, M., Webster, J., Bailey, K., Best, S., DeLay, J., Detrisac, C., *et al.*, (2011). Proposal of a 2-Tier Histologic Grading System for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors to More Accurately Predict Biological Behavior. *Veterinary Pathology*, 48, 147-155.

Klauschen, F., Wienert, S., Schmitt, W.D., Loibl, S., Gerber, B., Blohmer, J.U., *et al.* (2015). Standardized Ki67 Diagnostics Using Automated Scoring—Clinical Validation in the GeparTrio Breast Cancer Study. *Clin. Cancer Res*, 21:3651–3657.

Klopfleisch, R., von Euler, H., Sarli, G., Pinho, S. S., Gartner, F., Gruber, A. D. (2011) Molecular carcinogenesis of canine mammary tumors: new from an old disease. *Vet Pathol* 48:98–116.

Konsti, J., Lundin, M., Joensuu, H., Lehtimäki, T., Sihto, H., Holli, K., *et al.* (2011) Development and evaluation of a virtual microscopy application for automated assessment of ki-67 expression in breast cancer. *BMC Clin Pathol* 11: 3.

Koopman, T., Buikema, H.J., Hollema, H., Bock, G.H., Vegt, B.V. (2018). Digital image analysis of Ki67 proliferation index in breast cancer using virtual dual staining on whole tissue sections: clinical validation and inter-platform agreement. *Breast Cancer Research and Treatment*, 169:33–42.

Kravis, L.D., Vail, D.M., Kisseberth, W.C., Ogilvie, G.K., Volk, L.M. (1996). Frequency of argyrophilic nucleolar organizer regions in fine-needle aspirates and biopsy specimens from mast cell tumors in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 209:1418–1420.

Kurilj, A.G., Hohšteter, M., Artukovi, B., Severin, K., Šoštari, I., Zuckermann, -, *et al.* (2011). Histopathological evaluation and immunohistochemical study of estrogen receptor α , HER-2 and Ki-67 in canine neoplastic mammary lesions.

Kurzman, I.D., Gilbertson, S.R. (1986). Prognostic factors in canine mammary tumors. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)*, 1 (1): 25–32.

Lana, S.E., Rutteman, G.R., Withrow, S.J. (2007). Tumors of the mammary gland. In *Small Animal Clinical Oncology*. 4th edition. Edited by Withrow SJ, MacEwen EG. St. Louis: Saunders Elsevier, 619–636.

Landis, J., & Koch, G. (1977). The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics*, 33(1), 159-174.

Lavalle, G.E., Bertagnolli, A.C., Tavares, W.L., Cassali GD. (2009). Cox-2 expression in canine mammary carcinomas: correlation with angiogenesis and overall survival. *Vet Pathol*, 46(6):1275–1280.

Layton, F., Hopkins, C.L. (1993). Pathologic correlates of prognosis in lymph node positive breast carcinomas. *Cancer*, v.71, p.1780-1790.

Le Doussal, V., Tubiana-Hulin, M., Friedman, S. (1989). Prognostic value of histologic grade nuclear components of Scarff-Bloom- Richardson (SBR): An improvement score modification based on a multivariate analysis of 1262 invasive ductal breast carcinoma. *Cancer*, v.64, v.1914-1921.

Lee, C.H., Kim, W.H., Lim, J.H., Kang, M.S., Kim, D.Y., Kweon, O.K. (2004). Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. *J Vet Sci*, 5(1):63–69.

Lelyveld, S.V., Warland, J., Miller, R., Maw, H., Foale, R., Goodfellow, M.J. *et al* (2015). Comparison between Ki-67 index and mitotic index for predicting outcome in canine mast cell tumours. *Small Animal Practice*. 56:312–319

Letard, S., Yang, Y., Hanssens, K., Palmérini, F., Leventhal, P.S., Guéry, S., *et al.* (2008). Gain-of-function mutations in the extracellular domain of KIT are common in canine mast cell tumors. *Mol Cancer Res*, 6(7):1137–1145.

Lohr, C. V., Teitke, J. P., Failing, K., Weis, E. (1997). Characterization of the Proliferation State in Canine Mammary Tumors by the Standardized AgNOR Method with Postfixation and Immunohistologic Detection of Ki-67 and PCNA. *Vet Pathol*, 34:212-221.

Luong, R.H., Baer, K.E., Craft, D.M., Ettinger, S.N., Scase, T.J., Bergman, P.J. (2006). Prognostic significance of intratumoral microvessel density in canine soft-tissue sarcomas. *Vet Pathol*, 43:622–631.

MacEwen, E.G., Hayes, A.A., Harvey, H.J., Patnaik, A.K., Mooney, S., Passe, S. (1984). Prognostic factors for feline mammary tumors. *J Am Vet Med Assoc*, 185(2):201–204.

Maglennon, G. A., Murphy, S., Adams, V., Miller, J., Smith, K., Blunden, A., *et al.* (2008). Association of Ki67 index with prognosis for intermediate-grade canine cutaneous mast cell tumours. *Veterinary and Comparative Oncology* 6, 268-274.

Martinez-Lara, I., González-Moles, M.A., Ruiz-Avila, I., Bravo, M., Ramos, M.C., Fernández-Martinez, J.A. (1996). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as a marker of dysplasia in oral mucosa. *Acta Stomatol. Belg.* 93(1):29-32.

Matos, A.J.F., Lopes, C.C.C., Faustino, A.M.R., Carvalheira, J.G.V., Santos, M.S.A., Rutteman, G.R., *et al.* (2006). MIB-1 indices according to clinico-pathological variables in canine mammary tumours: a multivariate study. *Anticancer Res*, 26:1821–1826.

McMormick, D., Hall, P.A. (1992). The complexities of proliferating cell nuclear antigen. *Histopathology* 21(6):591-594.

McNiel, E.A., Prink, A.L., O'Brien, T.D. (2006). Evaluation of risk and clinical outcome of mast cell tumours in pug dogs. *Vet Comp Oncol*, 4(1):2–8.

Mengel, M., von Wasielewski, R., Wiese, B., Rudiger, T., Muller-Hermelink, H.K., Kreipe, H. (2002). Inter-laboratory and inter-observer reproducibility of immunohistochemical assessment of the Ki-67 labelling index in a large multi-centre trial. *J Pathol*, 198(3):292–299.

Meuten, D. J., Moore, F. M., George, J. W. (2017). Appendix: Diagnostic Schemes and Algorithms. Mitotic count. In: Meuten D.J. (Eds.) *Tumors in domestic animals* (5th Ed., pp. 943-945) Ames, Iowa: John Wiley & Sons Inc.

Mighell, A. (1995). PCNA and p53. *Eur J Cancer B Oral Oncol*, 31B:403-4.

Mikami, Y., Ueno, T., Yoshimura, K., Tsuda, H., Kurosumi, M., Masuda, S., *et al.* (2013). Interobserver concordance of Ki67 labeling index in breast cancer: Japan Breast Cancer Research Group Ki67 Ring Study. *Cancer Sci*, 104(11):1539–1543.

Millanta, F., Calandrella, M., Vannozzi, I., Poli, A. (2006). Steroid hormone receptors in normal, dysplastic and neoplastic feline mammary tissues and their prognostic significance. *Veterinary Record*, 158:821–824.

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

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

Misdorp, W., Else, R.W., Helmén, E., Lipscomb, T.P. (1999). Histological classification of the mammary tumors of the dog and the cat. In *World Health Organization International*

Histological Classification of Tumours of Domestic Animals. 2nd edition. Edited by Shulman FL. Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology, 11–56.

Mohammed, Z.M.A., McMillan, D.C., Elsberger, B., Going, J.J., Orange, C., Mallon, E., et al. (2012). Comparison of Visual and automated assessment of Ki-67 proliferative activity and their impact on outcome in primary operable invasive ductal breast cancer. *Br J Cancer*, 106(2):383–388.

Moldovan, G.L., Pfander, B., Jentsch, S. (2007). PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* 129:665–679.

Morris, J.S., Nixon, C., King, O.J., Morgan, I.M., Philbey, A.W. (2009). Expression of TopBP1 in canine mammary neoplasia in relation to histological type, Ki67, ER α and p53. *Vet. J.* 179, 422-429.

Mottolese, M., Morelli, L., Agrimi, U., Benevolo, M., Sciarretta, F., Antonucci, G., et al. (1994). Spontaneous canine mammary tumors: a model for monoclonal antibody diagnosis and treatment of human breast cancer. *Lab Invest*, 71(2):182–187.

Moulton, J.E. (1978). *Tumors in Domestic Animals*, 2nd ed. Berkeley, CA: University of California Press, 367–369.

Mukaratirwa, S. (2005). Prognostic and predictive markers in canine tumours: rationale and relevance. A review. *Vet Q*, 27(2):52–64.

Murphy, S., Sparkes, A.H., Smith, K.C., Blunden, A.S., Brearley, M.J. (2004). Relationships between the histological grade of cutaneous mast cell tumours in dogs, their survival and the efficacy of surgical resection, *Vet Rec* 154:743-746.

Muto, T., Wakui, S., Takahashi, H., Maekawa, S., Masaoka, T., Ushigome, S., et al. (2000). p53 gene mutations occurring in spontaneous benign and malignant mammary tumors of the dog. *Vet. Pathol.* 37, 248-253.

Nielsen, S.W. (1967). The malignancy of mammary tumors in cats. *Mod Vet Pract*, 33:245–252.

Nielsen, P.S., Bentzer, N.K., Jensen, V., Steiniche, T., Jylling, A.M. (2014). Immunohistochemical Ki-67/KL1 double stains increase accuracy of Ki-67 indices in breast cancer and simplify automated image analysis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 22(8):568–576.

Nieto, A., Peña, L., Pérezalenza, M.D., Sánchez, M.A., Flores, J.M., Castaño, M. (2000). Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Vet Pathol*, 37(3):239.

Niu, G., Sun, X., Cao, Q., Courter, D., Koong, A., Le, Q.T., *et al.* (2010). Cetuximab-based immunotherapy and radio-immunotherapy of head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 16(7):2095–2105.

Oyama, T., Mitsudomi, T., Mizone, T., Ohgami, T., Nakanishi, R., Yasumoto, K. (1995). Proliferating cell nuclear antigen may be superior to argyrophilic nucleolar organizer regions in predicting shortened survival of patients with non-small cell lung cancer. *Surg. Oncol*, 4: 83–89.

Papadopoulos, F., Spinelli, M., Valente, S., Foroni, L., Orrico, C., Alviano, F., *et al.* (2007). Common tasks in microscopic and ultrastructural image analysis using ImageJ. *Ultrastruct Pathol*, 31(4–6):401–407.

Patnaik, A. K., Ehler, W. J. & MacEwen, E. G. (1984). Canine cutaneous mast cell tumors: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Veterinary Pathology*, 21, 469-474.

Peña, L.L., Nieto, A.I., 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.

Pereira, P.D., Carvalheira, J., Gartner, F. (2004). Cell proliferation in feline normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissue: an immunohistochemical study. *Vet J*, 168:180–185.

- Pérez Alenza, M.D., Peña, L., Del Castillo, N. (2000). Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumors. *J Small Anim Pract*, 41:287–291.
- Pérez Alenza, M.D., Peña, L., Nieto, I., Castaño, M. (1997). Clinical and pathological prognostic factors in canine mammary tumors. *Ann Ist Super Sanita*, 33:581–585.
- Pérez Alenza, M.D., Rutteman, G.R., Kuipers-Dijkshoorn, N.J., Peña, L., Montoya, A., Misdorp, W., *et al.* (1995): DNA flow cytometry of canine mammary tumours: the relationship of DNA ploidy and S-phase fraction to clinical and histological features. *Res. Vet. Sci.* 58, 238- 243.
- Polley, M.Y., Leung, S.C., McShane, L.M., Gao, D., Hugh, J.C., Mastropasqua, M.G., *et al.* (2013). An International Ki67 Reproducibility Study. *J Natl Cancer Inst*, 105(24):1897–1906.
- Preziosi, R., Sarli, G., Benazzi, C., Mandrioli, L., Marcato, P.S. (2002). Multiparametric survival analysis of histological stage and proliferative activity in feline mammary carcinomas. *Res Vet Sci*, 73:53–60.
- Queiroga, F.L., Pires, I., Parente, M., Gregório, H., Lopes, C.S. (2011). COX-2 over-expression correlates with VEGF and tumour angiogenesis in canine mammary cancer. *Vet J*, 189(1): 77–82.
- Rasotto, R., Caliarì, D., Castagnaro, M., Zanetti, R., Zappulli, V. (2011). An immunohistochemical study of HER-2 expression in feline mammary tumours. *J Comp Path*, 144(2–3):170–179.
- Raynaud, J.P., Cotard, M., Andre, F., Mialot, J.P., Rolland, P.H., Martin, P.M. (1981). Spontaneous canine mammary tumour: a model for human endocrine therapy? *J Steroid Biochem*, 15:201–207.
- Rivera, P., Melin, M., Biagi, T., Fall, T., Häggström, J., Lindblad-Toh, K., *et al.* (2009). Mammary tumor development in dogs is associated with BRCA1 and BRCA2, *Cancer Res* 69:8770– 8774.

Roge, R., Riber-Hansen, R., Nielsen, S., Vyberg, M. (2016). Proliferation assessment in breast carcinomas using digital image analysis based on virtual Ki67/cytokeratin double staining. *Breast Cancer Research and Treatment*, 158(1):11–19.

Rothwell, T.L., Howlett, C.R., Middleton, D.J., Griffiths, D.A., Duff, B.C. (1987). Skin neoplasms of dogs in Sydney, *Aust Vet J* 64:161-164.

Romansik, E.M., Reilly, C.M., Kass, P.H., Moore, P.F., London, C.A. (2007). Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology*, 44: 335–341.

Rudas, M., Gnant, M.F., Mittlböck, M., Neumayer, R., Kummer, A., Jakesz, R., Reiner, G., Reiner, A. (1994). Thymidine labeling index and Ki-67 growth fraction in breast cancer: comparison and correlation with prognosis. *Breast Cancer Res Treat*, 32(2):165–175.

Sanchez, J., Ramirez, G.A., Buendia, A.J., Vilafranca, M., Martinez, C.M., Altimira, J., *et al.* (2007). Immuno- histochemical characterization and evaluation of prognostic factors in canine oral melanomas with osteocartilaginous differentiation. *Vet Pathol* 44:676–682.

Sanchez, Y., Elledge, S.J. (1995). Stopped for repairs. *Bioessays* 17:545- 548.

Tsuji, T., Shrestha, P., Yamada, K., Shinozaki, F., Sasaki, K., Maeda, K., *et al.* (1992). Proliferating cell nuclear antigen in malignant and pre- malignant lesions of epithelial origin in the oral cavity and skin: an immunohistochemical study. *Virchows Archiv A, Pathol. Anat.* 420:377- 383.

Santos, A.A., Lopes, C.C., Ribeiro, J.R., Martins, L.R., Santos, J.C., Amorim, I.F., *et al.* (2013). Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: A multivariable survival study. *BMC Vet Res*, 9:1.

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

Sassi, F., Benazzi, C., Castellani, G., Sarli, G. (2010). Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. *BMC Vet Res*, 6:5.

Scase ,T.J., Edwards, D., Miller, J., Henley, W., Smith, K., Blunden, A., *et al.* (2006) Canine mast cell tumors: correlation of apoptosis and proliferation markers with prognosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20: 151–158.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., *et al.* (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 9, 676–682.

Schindelin, J., Rueden, C. T., Hiner, M. C., Eliceiri, K. W. (2015). The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Molecular Reproduction and Development*, 82, 518–529.

Schneider, R. (1970). Comparison of age, sex, and incidence rates in human and canine breast cancer, *Cancer* 26:419–426.

Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9, 671–675.

Scully, C., Field, J.K., Tanzawa, H. (2000). Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol*, 36:256-63.

Seguin, B., Besancon, M.F., McCallan, J.L., Dewe, L.L., Tenwolde, M.C., Wong, E.K., *et al.* (2006). Recurrence rate, clinical outcome, and cellular proliferation indices as prognostic indicators after incomplete surgical excision of cutaneous grade II mast cell tumors: 28 dogs (1994–2002). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20: 933–940.

Seixas, F., Palmeira, C., Pires, M.A., Bento, M.J., Lopes, C. (2011). Grade is an independent prognostic factor for feline mammary carcinomas: a clinicopathological and survival analysis. *Vet J*, 187(1):65–71.

Sennazli, G., Yildirim, F., Serdar Arun, S., Gurel, A., & Sonmez, K. (2015). Immunohistochemical detection of tumour cell proliferation and intratumoural microvessel density in canine malignant mammary tumours, *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 59(2), 255-261

Simoes, J.P., Schoning, P., Butine, M. (1994). Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods. *Veterinary Pathology*, 31:637–647.

Simon, D., Schoenrock, D., Baumgärtner, W., Nolte, I. (2006). Postoperative adjuvant treatment of invasive malignant mammary gland tumors in dogs with doxorubicin and docetaxel. *J Vet Intern Med*, 20: 1184–1190.

Sirri, V., Roussel, P., Hernandez-Verdun, D. (2000). The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. *Micron*, 31(2):121–126.

Skaland, I., van Diest, P.J., Janssen, E.A., Gudlaugsson, E., Baak, J.P. (2008). Prognostic differences of World Health Organization-assessed mitotic activity index and mitotic impression by quick scanning in invasive ductal breast cancer patients younger than 55 years. *Human Pathology* 39, 584-590.

Soares, M., Ribeiro, R., Carvalho, S., Peleteiro, M., Correia, J., Ferreira, F. (2016). Ki-67 as a prognostic factor in feline mammary carcinoma: What is the optimal cutoff value? *Vet. Pathol*, 53:37–43.

Sorenmo, K. (2003). Canine mammary gland tumors. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 33:573–596.

Sorenmo, K.U., Worley, D.R., Goldschmidt, M.H. (2013). Tumors of the mammary gland. In: Withrow SJ, Vail DM, Page RL, eds. *Small Animal Clinical Oncology*. 5th ed. Missouri, MO: Saunders, 538–556.

Spangler, W.L., Culbertson, M.R., Kass, P.H. (1994). Primary mesenchymal (nonangiomatous/nonlymphomatous) neoplasms occurring in the canine spleen: anatomic classification, immunohistochemistry, and mitotic activity correlated with patient survival. *Vet Pathol*, 31:37–47.

Spangler, W.L., Kass, P.H. (2006). The histologic and epidemiologic bases for prognostic considerations in canine melanocytic neoplasia. *Vet Pathol*, 43:136–149.

Sundara Rajan, S, Horgan, K., Speirs, V., Hanby, A.M. (2013). External validation of the ImmunoRatio image analysis application for ER α determination in breast cancer. *J Clin Pathol*, 67:72–5.

Taylor, G.N., Shabestari, L., Williams, J., Mays, C.W., Angus, W., McFarland, S. (1976). Mammary neoplasia in a closed beagle colony, *Cancer Res* 36:2740–2743.

Thompson, J.J., Pearl, D.L., Yager, J.A., Best, S.J., Coomber, B.L., Foster, R.A. (2011). Canine subcutaneous mast cell tumor: characterization and prognostic indices. *Vet Pathol*, 48(1):156–168.

Thuróczy, J., Reisvaag, G.J., Perge, E., Tibold, A., Szilágyi, J., Balogh, L. (2007). Immunohistochemical detection of progesterone and cellular proliferation in canine mammary tumours. *J. Comp. Pathol.* 137, 122-129.

Tumuluri, V., Thomas, G.A., Fraser, I.S. (2002) Analysis of the Ki-67 antigen at the invasive tumour front of human oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 31:598-604.

Tuominen, V. J., Ruotoistenmäki, S., Viitanen, A., Jumppanen, M., Isola J. (2010). ImmunoRatio: a publicly available web application for quantitative image analysis of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and Ki-67. *Breast Cancer Research*, 12(4):R5.

Vail, D.M., MacEwen, E.G. (2000). Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer Invest*, 18(8):781–792.

Van Diest, J.P., Baak, J.P.A., Matze-Cok, P., et al. (1992). Reproducibility of mitosis counting in 2469 breast cancer specimens: Results from the multicenter morphometric mammary carcinoma project. *Hum. Pathol.*, v.23, p.603-607.

Van Diest, P.J., Brugal, G., Baak, J.P. (1998). Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *J Clin Pathol*.51:716-24.

Vascellari, M., Baioni, E., Ru, G., Carminato A., Mutinelli, F. (2009). Animal tumour registry of two provinces in northern Italy: incidence of spontaneous tumours in dogs and cats. *BMC Vet Res*, 5:39.

Vascellari, M., Giantin, M., Capello, K., Carminato, A., Morello, E.M., Vercelli, A., et al. (2013). Expression of Ki67, BCL-2, and COX-2 in canine cutaneous mast cell tumors: association with grading and prognosis. *Veterinary Pathology* 50, 110–121.

Veronese, S.M., Gambacorta, M. (1992). Detection of Ki-67 proliferation rate in breast cancer—correlation with clinical and pathologic features. *Am J Clin Pathol*, 95:30-34.

Vörös, A., Csörg, ő. E., Nyári, T., Cserni, G. (2013). An intra- and interobserver reproducibility analysis of the Ki-67 proliferation marker assessment on core biopsies of breast cancer patients and its potential clinical implications. *Pathobiology*, 80(3):111–118.

Vörös, A., Csörg, ő. E., Kővári, B., Lázár, P., Kelemen, G., Ruzs, O., et al. (2014). Different Methods of Pretreatment Ki- 67 Labeling Index Evaluation in Core Biopsies of Breast Cancer Patients Treated with Neoadjuvant Chemotherapy and Their Relation to Response to Therapy. *Pathol Oncol Res*, 21(1):147–155.

Webster, J.D., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Miller, R.A., Kaneene, J.B., Kiupel, M. (2007). Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication. *Vet Pathol*, 44: 298–308.

- Weidner, N., Moore, I.I.D.H., Vartanian, R. (1994). Correlation of Ki-67 antigen expression with mitotic figure index and tumor grade in breast carcinomas using the novel “paraffin”-reactive MIB-1 antibody. *Hum. Pathol.*, v.25, p.337-342.
- Weijer, K., Head, K.W., Misdorp, W., Hampe, J.F. (1972). Feline malignant mammary tumors. I. Morphology and biology: some comparisons with human and canine mammary carcinomas, *J Natl Cancer Inst* 49:1697–1704.
- Weijer, K., Hart, A.A.M. (1983). Prognostic factors in feline mammary carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 70:709–716.
- Wong, S.C., Chan, J.K., Lo, E.S., Chan, A.K., Wong, M.C., Chan, C.M., *et al.* (2007). The contribution of bifunctional SkipDewax pretreatment solution, rabbit monoclonal antibodies, and polymer detection systems in immunohistochemistry. *Arch Pathol Lab Med*, 131(7):1047–1055.
- Yang, W.Y., Liu, C.H., Chang, C.J., Lee, C.C., Chang, K.J., Lin, C.T. (2006). Proliferative activity, apoptosis and expression of oestrogen receptor and Bcl-2 oncoprotein in canine mammary tumours. *J. Comp. Pathol.* 134, 70-79.
- Yeo, M.K., Kim, H.E., Kim, S.H., Chae, B.J., Song, B.J., Lee, A. (2017). Clinical usefulness of the free web-based image analysis application ImmunoRatio for assessment of Ki-67 labelling index in breast cancer. *J. Clin. Pathol*, 70:715–719.
- Yerushalmi, R., Woods, R., Ravdin, P.M., Hayes, M.M., Gelmon, K.A. (2010). Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol*, 11:174–183.
- Zabaglo, L., Salter, J., Anderson, H., Quinn, E., Hills, M., Detre, S., *et al.* (2010). Comparative validation of the SP6 antibody to Ki67 in breast cancer. *J Clin Pathol*, 63(9):800–804.
- Zhong, F., Bi, R., Yu, B., Yang, F., Yang, W., Shui, R. (2016). A comparison of visual assessment and automated digital image analysis of Ki67 labeling index in breast Cancer. *PLoS One*, 11(2):e0150505.

Zuccari, D. A., Santana, A. E., Cury, P. M., Cordeiro, J. A. (2004). Immunocytochemical study of Ki-67 as a prognostic marker in canine mammary neoplasia. *Vet. Clin. Pathol.* 33(1) : 23–28.

Zuccari, D. A.P.C., Pavam, M.V., Terzian, C.B., Pereira, R.S., Ruiz, C.M., Andrade, J.C.(2008). Immunohistochemical evaluation of e-cadherin, Ki-67 and PCNA in canine mammary neoplasias: correlation of prognostic factors and clinical outcome. *Pesq Veta Bras*, 28(4), 207-215.