

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**Nicolle Pereira Soares
Médica Veterinária**

**Estudo de neoplasias mamárias de cadelas em
Uberlândia e imunomarcação para
ciclooxigenase 2**

**Uberlândia - Minas Gerais - Brasil
2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**Estudo de neoplasias mamárias de cadelas em
Uberlândia e imunomarcação para
ciclooxygenase 2**

Nicolle Pereira Soares

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia – UFU como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias (Clínica Médica e Investigação Etiológica).

Uberlândia - Minas Gerais - Brasil
Maio de 2015

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

S676e Soares, Nicolle Pereira, 1985
2015 Estudo de neoplasias mamárias de cadelas em Uberlândia e
imunomarcação para ciclooxygenase 2 / Nicolle Pereira Soares. - 2015.
63 p. : il.

Orientadora: Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Glândulas mamárias - Cancer - Teses. 3.
Imunohistoquímica - Teses. 4. Câncer em cão - Teses. I. Medeiros-
Ronchi, Alessandra Aparecida . II. Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela oportunidade da vida, que eu tanto prezo e amo. Por cada dia, que Ele me oferece um novo recomeço.

Agradeço aos meus pais Edna e Eli, eu sou o melhor pedacinho de cada um deles. E minha irmã Raquel, minha amiga e pessoa adorável, sem a qual não seria quem sou hoje. Eu amo vocês.

A minha vó, exemplo de persistência com sua luta diária.

A minha tia Elindalva e minhas primas que tanto amo, Isabella e Mirela.

Ao meu eterno amor, amor da minha vida, Artur. Por cada dia, momento e minuto que se dedicou para me fazer feliz, por estar ao meu lado, ser meu amigo, meu sonho, meu noivo.

A todos meus amigos, pela amizade e apoio, em especial minha amiga Éllen Simão.

A Universidade Federal de Uberlândia e Faculdade de Medicina Veterinária por todos os recursos oferecidos para minha formação e realização deste trabalho.

A Capes, pela bolsa de incentivo aos meus estudos.

A todos os amigos do laboratório de Patologia Animal, Lígia, Arlinda, Samyla, em especial, Prof Márcio e Prof Matias.

A meus amigos e colaboradores que confiaram em mim e no meu trabalho.

Apoiaram-me e me ajudaram-me sempre, em especial, Thaís Almeida e Igor Paula de Castro.

A professora Alessandra, minha mestra! Pessoa quem admiro, respeito, sinto carinho e gratidão por todos os conhecimentos a mim passados, pela confiança em mim depositada, pelos conselhos, pela disposição, pela dedicação e apoio.

A todos os funcionários, veterinários e amigos do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia.

A Suzana Akemi, que sempre me ajudou, me incentivou e me apoiou com carinho e amizade.

E finalmente agradeço a todos os animais e proprietários, que me proporcionaram algum conhecimento durante toda minha formação acadêmica e colaboraram para a realização deste trabalho, em especial minhas cadelas Ursa e Nhonho.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 8 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 10 |
| 2.1 Anatomia e Histologia da glândula mamária | 10 |
| 2.2 Epidemiologia das neoplasias mamárias | 11 |
| 2.3 Etiologia e fatores predisponentes das neoplasias mamárias | 13 |
| 2.4 Diagnóstico | 17 |
| 2.5 Estadiamento ou Classificação clínica TNM..... | 19 |
| 2.6 Ciclooxygenase 2 (Cox 2) | 20 |
| 2.7 Tratamento | 22 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 24 |
| 3.1 Cálculo da amostra | 24 |
| 3.2 Amostras e critérios de inclusão e exclusão..... | 24 |
| 3.3 Avaliação das neoplasias mamárias | 25 |
| 3.3.1 Dados dos animais e das neoplasias | 25 |
| 3.3.2 Tamanho dos tumores mamários..... | 25 |
| 3.3.3 Estadiamento clínico dos tumores mamários | 25 |
| 3.3.4 Histopatologia e classificação histológica dos tumores mamários | 26 |
| 3.3.5 Imunohistoquímica | 27 |
| 3.3.6 Avaliação de lâminas de imunohistoquímica | 28 |
| 3.4 Análises estatísticas | 29 |
| 4 RESULTADOS | 30 |
| 5 DISCUSSÃO | 44 |
| 6 CONCLUSÕES | 52 |
| 7 REFERÊNCIAS | 53 |

TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Classificação histológica e frequência das lesões mamárias observada em cadelas, Uberlândia, MG, 2015..... | 32 |
| Tabela 2. Frequência de carcinomas mamários de cadelas de acordo com o grau histológico, Uberlândia, MG, 2015..... | 34 |
| Tabela 3. Frequência de cadelas com neoplasias mamárias malignas e classificação TNM, Uberlândia, MG, 2015..... | 35 |

FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Frequência de cadelas com neoplasias mamárias de acordo com a idade, Uberlândia, MG, 2015..... | 30 |
| Figura 2. Frequência de cadelas com neoplasias mamárias de acordo com estadiamento clínico – TNM, Uberlândia, MG, 2015..... | 31 |
| Figura 3. A. Fotomicrografia de adenoma mamário de cedula. Notar proliferação de células epiteliais benignas formando túbulos (seta), com conteúdo róseo vítreo no interior (*), aumento de 40x, hematoxilina e eosina (HE) B. Fotomicrografia de carcinoma complexo mamário de cedula. Notar proliferação de células epiteliais e mioepiteliais desordenadas (seta) e pouca formação tubular, aumento de 40x, HE..... | 33 |
| Figura 4. Frequência das lesões em mamas de cadelas de acordo com o percentual de células marcadas por Cox 2, Uberlândia, MG, 2015. | 36 |
| Figura 5. Frequência de amostras imunomarcadas por Cox 2 de acordo com o tipo de carcinoma mamário simples e complexo de cadelas e o percentual de marcação, Uberlândia, MG, 2015..... | 37 |
| Figura 6. Frequência de amostras imunomarcadas por Cox 2 de acordo com o tipo de carcinoma mamário de cadelas e percentual de marcação, Uberlândia, MG, 2015. | 38 |
| Figura 7. Fotomicrografia de carcinoma tubulopapilar em mama de cedula com imunomarcação para Cox 2 pela técnica de imunohistoquímica. A. Notar grupo de células epiteliais neoplásicas imunomarcadas, 100x, contra coloração, Hematoxilina de Harris. B. As células epiteliais apresentam citoplasma de coloração marrom (seta), indicando a presença de enzima Cox 2, 400x, contra coloração Hematoxilina de Harris..... | 38 |
| Figura 8. Frequência de tipos de carcinomas de acordo com a intensidade de marcação e Cox 2 nas células epiteliais mamárias de cadelas, Uberlândia, MG, 2015..... | 39 |
| Figura 9. Frequência de amostras de mama de cadelas de acordo com o escore de imunomarcação e o comportamento tumoral, Uberlândia, MG, 2015. | 40 |
| Figura 10. Frequência de tipos histológicos e escore de marcação de Cox 2 em amostras de mama de cadelas, Uberlândia, MG, 2015..... | 41 |
| Figura 11. Frequência de tipos de carcinomas mamários de cadelas de acordo com escore de marcação, Uberlândia, MG, 2015. | 41 |
| Figura 12. Frequência de cadelas de acordo com o TNM e escore de imunomarcação de Cox 2, Uberlândia, MG, 2015..... | 42 |

ESTUDO DE NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE CADELAS EM UBERLÂNDIA E IMUNOMARCAÇÃO PARA CICLOOXYGENASE 2

Resumo - A ciclooxigenase 2 (Cox 2) é um marcador molecular indicador de prognóstico e sua expressão está relacionada com a progressão do tumor mamário na cadelas. Tendo isso em vista, o objetivo deste trabalho foi investigar tumores mamários de cadelas a expressão de Cox 2 por meio de imunohistoquímica e correlacionar com o estadiamento clínico, o tamanho tumoral, o envolvimento linfonodal, a classificação e o grau histológico dos carcinomas. Foram incluídas neste estudo, 100 cadelas com neoplasia mamária e dessas, 131 amostras foram analisadas. A avaliação histológica e da imunomarcação de Cox 2 foram conduzidas. Para a imunohistoquímica (IHQ), utilizou-se a técnica de estreptoavidina-biotinaperoxidase. Para análise das lâminas de IHQ contou-se o número de células marcadas em dez campos e verificou-se a intensidade de marcação. O escore de marcação foi obtido pelo produto do número de células marcadas e a intensidade de marcação. O tipo histológico mais frequente diagnosticado foi o carcinoma complexo mamário. A expressão de Cox 2 foi observada nos tumores benignos e malignos. A marcação fraca é mais frequente, sendo a marcação forte observada nos carcinomas. Os carcinomas simples apresentaram maior número de células marcadas. Não houve correlação positiva entre o tipo histológico, tamanho e o envolvimento linfonodal e a imunomarcação de Cox 2. Sendo assim, a imunomarcação de Cox 2 não demonstrou ser um bom fator de prognóstico.

Palavras – chave: cães, carcinomas, Cox 2, glândula mamária imunohistoquímica.

RESEARCH OF MAMMARY TUMORS IN FEMALE DOGS IN UBERLÂNDIA AND CYCLOOXYGENASE 2 IMMUNOSTAINING

Abstract - The cyclooxygenase 2 (Cox 2) is a molecular indicator of prognosis marker and its expression is associated with progression of mammary tumors in dogs. The purpose of this study was to investigate breast tumors of bitches Cox 2 expression by immunohistochemistry and correlated with the clinical stage, tumor size, lymph node involvement, the classification and the histological grade of carcinomas. We included in this study, 100 female dogs with mammary tumors and 131 samples were analyzed. Histological and COX 2 immunostaining evaluation were conducted. The streptavidin-biotinaperoxidase technique was used in order to do the immunohistochemistry (IHC). The IHC analysis was performed counting the number of positive-staining cells in ten fields and the staining intensity. The COX 2 staining index was obtained by multiplying the COX 2 staining distribution and intensity scores. This gave a range of COX 2 staining indices of 0–12. Carcinoma complex was the most common histological type that we were diagnosed. The COX 2 expression was observed in the benign and malignant tumors. The weak score is more frequent, and strong score was observed in carcinomas. Simple carcinomas demonstrated a higher number of positive staining cells. There was no positive correlation between the histological type, size and lymph node involvement and the Cox 2 immunostaining. Therefore, COX 2 immunostaining is not a good prognostic factor.

Keywords: bitch, carcinoma, cyclooxygenase-2, immunohistochemistry, mammary gland

1 INTRODUÇÃO

Os tumores mamários são o tipo de neoplasia mais frequente em cadelas, sendo essa frequência, duas a três vezes superior à observada na mulher (CASSALI *et al.*, 2009). Na cedula, as neoplasias mamárias representam 7,5% das causas de morte (CASSALI *et al.*, 2009), mais de 70% dos casos são de caráter maligno e em mais 25% dos casos apresentam metástases em linfonodos axilares ou inguinais (OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2010). Acometem cadelas adultas e idosas e todas as raças de cães, entretanto quando precocemente diagnosticadas, o prognóstico é favorável (CASSALI *et al.*, 2009; DORÉ *et al.*, 2003).

Marcadores moleculares são utilizados nas neoplasias mamárias caninas para confirmação de diagnósticos, fornecer prognóstico e principalmente a buscar novos protocolos terapêuticos (ZUCCARI *et al.*, 2008, JASCKSTET, 2013).

A ciclooxigenase (Cox) é uma classe de enzimas catalíticas relacionadas à formação de mediadores inflamatórios. A isoenzima Cox-1 é expressa por diversos tecidos e relaciona-se a manutenção da homeostasia, enquanto a Cox 2 é expressa no processo inflamatório e no desenvolvimento tumoral (HORTA *et al.*, 2012; MARQUES, 2013). A expressão de Cox 2 em processos neoplásicos, tanto em humanos como em cadelas está relacionada ao prognóstico ruim para vários tipos histológicos. A enzima Cox 2 participa no metabolismo do ácido araquidônico, gerando prostaglandinas que podem mediar proliferação celular, destruição da membrana basal, apoptose, a modulação do sistema imune e angiogênese, agravando o prognóstico (HORTA *et al.*, 2012, LAVALLE *et al.*, 2009).

Na medicina humana, a expressão de Cox 2 em carcinomas de mama e cólon está relacionada aos piores prognósticos. Nas cadelas, tumores mamários malignos expressam mais essa enzima, em relação aos tumores benignos, independentemente do tipo histológico. Entretanto a implicação deste fato com a sobrevida ainda necessita de estudos (DORÉ *et al.*, 2003).

O mecanismo de atuação da Cox 2 na carcinogênese também deve ser investigado, assim como a existência de correlação com alguns fatores considerados prognósticos no câncer de mama da cedula. Além disso, conhecer a

expressão da Cox 2 nas neoplasias dos animais domésticos cria perspectivas para o desenvolvimento e utilização, na rotina oncológica dos hospitais veterinários, de drogas como inibidores seletivos da Cox 2 no tratamento do câncer, a exemplo do que já ocorre na medicina humana.

Perante esses aspectos, objetivou-se verificar nos tumores mamários de cadelas atendidas no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia, a imunomarcação de ciclooxygenase 2 por meio de imunohistoquímica e correlacionar com o estadiamento clínico, o tamanho tumoral, o envolvimento linfonodal, a classificação e o grau histológico dos carcinomas.

REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Anatomia e Histologia da glândula mamária

A cadelha possui dez glândulas mamárias, dispostas em duas filas, desde a região torácica até à região inguinal. Estas são designadas, no sentido crânio-caudal: torácicas craneais e caudais, abdominais craneais e caudais e inguinais (NOMINA ANATOMICA, 2012).

A glândula mamária, macroscopicamente é constituída por unidades glandulares distribuídas bilateralmente, simétricas e paralelas na linha mediana ventral. Microscopicamente, a glândula mamária é uma glândula sudorípara exócrina modificada, túculo-alveolar, especializada na produção e secreção de leite, característica específica dos mamíferos (GETTY, 2008).

Cada mama é constituída de um teto e um corpo da mama que são recobertos por pele. Em um corte longitudinal passando pela papila e pelo corpo da glândula, pode-se observar o corpo, constituído principalmente pela glândula mamária, dividida em septos conjuntivos, os lobos, que se dividem em lóbulos. Ductos excretores correm em direção à papila que se reúnem e formam os ductos lactíferos, para finalmente abrirem em uma cavidade denominada seio lactífero, espaço de coleta e armazenamento. O seio constitui-se de parte glandular, no corpo da mama e parte papilar. A parte papilar do seio lactífero comunica-se com o exterior por meio de um estreito canal, o ducto papilar (SAMUELSON, 2007).

Histologicamente, as unidades funcionais da glândula mamária são os alvéolos que se encontram agrupados em lóbulos. O epitélio de revestimento dos alvéolos e ductos é constituído por uma população dupla de células: uma camada interna de epitélio simples cúbico, cuja morfologia celular varia consoante os diversos estádios de atividade secretora; uma camada externa de células mioepiteliais fusiformes, cuja função é a contrair-se sob ação da oxitocina, promovendo a expulsão do leite (SAMUELSON, 2007).

Os lóbulos mamários encontram-se separados entre si por tecido conjuntivo, sendo este fibroso, moderadamente denso. Já o tecido conjuntivo que reveste os ductos alveolares, denominado tecido intralobular, é menos denso e mais celular. Os

constituintes celulares inflamatórios habituais do tecido intralobular são linfócitos e plasmócitos (MISDORP, 2002, SAMUELSON, 2007).

A irrigação sanguínea das glândulas mamárias das cadelas provém dos ramos intercostais das artérias torácica interna, intercostal e torácica lateral (glândulas torácicas craniais e caudais); da artéria epigástrica cranial superficial (glândula abdominal cranial), e das artérias epigástrica superficial caudal com irrigação complementar pelo ramo da artéria labial ventral (glândulas abdominais caudais e inguinais) (LUIZ *et al.*, 2002). A drenagem venosa das glândulas é similar à irrigação arterial, contudo pequenas veias podem cruzar a linha média entre as glândulas direita e esquerda (SLATTER, 1998).

A drenagem linfática das mamas torácicas craniais e caudais é feita pelo linfonodos axilares e das mamas abdominais caudais e mamas inguinais para os linfonodos inguinais superficiais. As mamas abdominais craniais podem apresentar drenagem mista (linfonodo axilar e inguinal). Essa drenagem pode sofrer variação individual, assim como ser influenciada pelo estádio da lactação ou presença de massa tecidual e/ou obstrutiva (BRAGULLA e KÖNIG, 2004). Os vasos linfáticos podem cruzar a linha média e penetrar nas paredes abdominal e torácica interligando algumas glândulas ipsolaterais, mas segundo alguns autores não existem comunicação entre as cadeias mamária direita e esquerda (PELETEIRO, 1994).

Contudo, há estudos que comprovam que a neoplasia mamária pode alterar a drenagem linfática padrão, formando novos canais de drenagem aumentando a rede vascular linfática. Assim há o recrutamento de maior número de linfonodos e dessa forma, pode haver ligação linfática entre as cadeias contralaterais (PEREIRA *et al.*, 2003).

2.2 Epidemiologia das neoplasias mamárias

A interação homem-animal tornou-se muito importante para os proprietários de cães e gatos. Devido essa interação, aumentou-se a preocupação com a sanidade, bem estar e longevidade dos animais. Fato que propiciaram a busca do médico veterinário para prevenção e diagnóstico precoce de enfermidades e

consequentemente, o crescimento da oncologia veterinária (QUEIROGA *et al.*, 2011).

As neoplasias mamárias nos caninos são as mais frequentes e acometem principalmente as fêmeas. Nos machos, a neoplasia mamária é rara e a ocorrência está associada a disfunções hormonais, como hiperestrogenismo decorrente de sertoliomas (MISDORP, 2002; PELETEIRO, 1994).

Geralmente acometem cadelas adultas a idosas, com idade superior a seis anos, sendo mais atingidas cadelas entre 10 e 11 anos. Apesar de incomum o aparecimento desta neoplasia em cadelas jovens, quando ocorrem, normalmente está associado à benignidade (DORÉ *et al.*, 2003, MISDORP, 2002).

Não há predisposição racial (DORÉ *et al.*, 2003), entretanto alguns estudos apontam maior incidência em cadelas Cocker Spaniel, Dachshund, Setter Inglês, Pointer, Fox Terrier Boxer e Beagle (MISDORP, 2002; ZATLOUKAL *et al.*, 2005). No entanto, é importante considerar que é difícil a determinação de predisposição racial, pois há uma variação das mesmas de acordo com o local e o tempo. Adicionalmente também existe uma grande percentagem de cães sem raça definida, e o estabelecimento de um padrão de raças predispostas é complexo (PELETEIRO, 1994).

Quanto à localização nas mamas, o desenvolvimento de tumores e de displasias aumenta nas glândulas caudais e inguinais por terem maior volume de tecido glandular (FELICIANO *et al.*, 2012). E quanto à morfologia, as neoplasias mamárias podem se apresentar como nódulos pequenos ou grandes, placas, aderidos ou móveis, únicos ou múltiplos, ulcerados, circunscritos, dependendo do comportamento biológico do tumor (JASCKSTET, 2013). Em relação à mobilidade, podem ser móveis ou aderidos, com envolvimento cutâneo e muscular. Ao corte, podem ter aspecto sólido, cístico ou misto, com possíveis focos de necrose (RUTTEMAN *et al.*, 2001).

Pelo fato de mais de 70% das neoplasias mamárias apresentarem características de malignidade, mais de 25% dos casos de pacientes com neoplasia mamária, apresentam metástase em linfonodo (OLIVERIA FILHO *et al.*, 2010). A distribuição dessas metástases é determinada de acordo com a drenagem sanguínea e linfática do local do tumor primário. Os locais de eleição para

metástases são os linfonodos regionais e principalmente os pulmões (De NARDI *et al.*, 2013). Isto ocorre devido ao intenso fluxo de sangue que passa por este órgão. A grande trama de capilares torna a circulação mais lenta e atua como um filtro para os agregados de células tumorais, que se alojam na árvore vascular, inserindo pseudópodos entre as células endoteliais e migrando para o parênquima pulmonar (CONTRAN *et al.*, 2000).

2.3 Etiologia e fatores predisponentes das neoplasias mamárias

Apesar de alguns fatores estarem estabelecidos quanto à etiologia das neoplasias mamárias, ainda há controvérsias sobre. Entretanto é considerada como hipóteses: a influência da dieta e obesidade, transcrição gênica, componentes genéticos, estresse oxidativo e principalmente, a influência hormonal (CASSALI *et al.*, 2004; PELETEIRO 1994; ZUCARI *et al.*, 2001).

A carcinogênese é caracterizada por mutações genéticas herdadas ou adquiridas pela ação dos carcinógenos que são agentes ambientais, químicos, hormonais, radioativos e virais (COTRAN *et al.*, 2000). A carcinogênese compreende quatros estádios: iniciação, promoção, progressão e conversão maligna das células. A iniciação ocorre devido exposição das células aos carcinógenos com resultado de mutação e formação de clones celulares atípicos. A promoção, fase na qual a multiplicação desses clones celulares ocorre. Nessa fase, se houver a supressão do contato com os carcinógenos pode interromper o processo de mutação gênica. A progressão e a conversão maligna das células, nessas fases, as células transformadas apresentam autonomia para proliferar e, pela perda da coesão e obtenção da mobilidade, tornando-se invasivas (CASSALI *et al.*, 2004).

O alvo principal das alterações gênicas são os proto-oncogenes, pois eles controlam a divisão mitótica ordenada das células. Quando mutados, os proto-oncogenes são transformados em oncogenes que devido às alterações de expressão, translocação ou rearranjo dos genes, são responsáveis pela produção de oncoproteínas. Os oncogenes e as oncoproteínas podem então, favorecer a proliferação celular por meio da progressão desordenada das células nas diversas fases do ciclo celular (MISDORP, 2002; CASSALI *et al.*, 2004).

Dentre as mutações cromossômicas de genes o BRCA-1 e BRCA-2, supressores tumorais envolvidos no controle da transcrição, podem sofrer mutações, e predispor o surgimento da neoplasia mamária (COTRAN et al., 2000).

Outros genes que podem sofrer mutações são APC e NF-1, supressores tumorais (COTRAN et al., 2000). A proteína APC citoplasmática, ao penetrar no núcleo, ativa a transcrição dos genes promotores do crescimento celular. Assim, mutações no gene APC estimulam a proliferação celular. A neurofibromina, produto do gene NF-1, regula a transdução de sinais pela proteína *ras* e ativa a GTPase, enzima que facilita a conversão da proteína *ras* ativa em *ras* inativa. A mutação ou perda do gene NF-1, a proteína *ras* é mantida no estado ativo, estimulando também a proliferação celular (CASSALI et al., 2004).

A dieta e a obesidade nos cães domésticos são fatores que sugerem o risco de desenvolvimento de tumores mamários. Em mulheres obesas, elevadas concentrações de estrógeno proveniente da transformação, no tecido adiposo, da androstenediona em estrona e posteriormente em estrógeno aumenta o risco de desenvolvimento de câncer (YOO et al., 2001). Acredita-se que o mesmo acontece nas cadelas (CASSALI et al., 2004; REIS, 2013).

Além disso, o papel da obesidade no desenvolvimento destas neoplasias parece resultar de ações da leptina e adiponectina (CLEARY et al., 2010; REIS, 2013). A leptina inibe a apoptose e estimula a proliferação celular enquanto a adiponectina reduz a proliferação celular e promove a apoptose. Essas substâncias produzidas pelo tecido adiposo sofrem alteração nas concentrações de acordo com o peso corporal, sendo assim, quando o peso e o índice de massa corporal aumentam, os níveis séricos de leptina aumentam e de adiponectina diminuem (ARTWOHL et al., 2002; REIS, 2013).

Segundo Sirivaidyapong (2003) 91,3% das cadelas que recebem petiscos ou são alimentadas com dieta caseira misturada ou não à ração, apresentaram tumor de mama. Estudos indicam que a alimentação caseira, rica em ingestão de carnes bovinas, suínas e gordura animal provocam além a obesidade e aumentam o desenvolvimento das neoplasias mamárias, tendo esses fatores atuação maior como promotor e não iniciador da carcinogênese (PELETEIRO, 1994; CONTRAN et al, 2000; SIRIVAIIDYAPONG, 2003).

O componente etiológico hormonal é o principal elemento estudado, principalmente pelo risco de aparecimento desse tumor nas cadelas castradas antes do primeiro cio ser de 0,05%, após o primeiro cio 8% e após o segundo, o risco aumenta para 26%. Os hormônios são responsáveis por grande parte do controle no metabolismo das células. Quando há descontrole da secreção hormonal ocorre a proliferação celular com consequentes mutações genéticas, levando a várias alterações, dentre elas o câncer (CASSALI *et al.*, 2004; CASSALI *et al.*, 2014; MISDORP, 2002).

Tanto na mama normal como na neoplásica, o crescimento tecidual é estimulado por hormônios e fatores de crescimento (MISDORP *et al.*, 2002). Os hormônios também apresentam grande importância no desenvolvimento das neoplasias mamárias em cadelas, sendo o estrógeno, a progesterona, a prolactina e o hormônio do crescimento os principais envolvidos (CASSALI *et al.*, 2004; CASSALI *et al.*, 2014; MISDORP, 2002). Acredita-se na relação capacidade proliferativa das células neoplásicas e a expressão de receptores hormonais, já que na cadela, tumores mamários benignos expressam maior número de receptores para progesterona e estrógeno, enquanto os carcinomas malignos apresentam menor concentração destes (CASSALI *et al.*, 2004; HORTA *et al.* 2012).

A intensidade e a duração de exposição do tecido mamário ao estrógeno e a prolactina determinarão o risco da proliferação do epitélio ductal das glândulas mamárias. A prolactina aumenta o número de receptores para estrógeno, facilitando a ação mitótica deste hormônio. Enquanto o estrógeno promove o crescimento celular por estimular a liberação do fator de crescimento tumoral α , fator de crescimento semelhante à insulina e por inibir o fator de crescimento tumoral β (MISDORP, 2002).

A progesterona na puberdade e na gestação participa ativamente no desenvolvimento mamário, entretanto quando isolada, não pode ser considerada como carcinogênica. Entretanto quando associado a outros fatores, como o estrógeno, apresenta um papel importante no desenvolvimento dos tumores mamários, devido ao fator proliferativo (CASSALI *et al.*, 2004; MISDORP, 2002).

Ao administrar progesterona exógena em cães ou gatos, há uma estimulação da síntese de hormônio do crescimento na glândula mamária, proliferação lóbulo-

alveolar e consequente hiperplasia de elementos mioepiteliais e secretórios, induzindo a formação de nódulos benignos em animais jovens (RUTTEMAN et al, 2001). O tecido mamário ao ser exposto constantemente a progesterona podem sofrer metaplasia maligna (MISDORP, 2002).

A pseudociese ocorre no diestro, fase do ciclo estral em que há um aumento de progesterona. Após sete dias do final dessa fase, os níveis de progesterona diminuem e há o aumento da concentração de estrógeno e prolactina. Nas pseudocieses recorrentes ou após a lactação, as concentrações de prolactina estão elevadas e causam retenção láctea e possível formação de neoplasias mamárias (MARTINS e LOPES, 2005).

A prolactina é um hormônio necessário para a manutenção da atividade secretória e isoladamente, não desempenha papel sobre a proliferação celular da glândula mamária (CASSALI et al., 2004; MARTINS e LOPES, 2005). Entretanto, não se pode descartar a possibilidade da própria prolactina estimular a atividade mitótica das células do epitélio mamário, já que o risco de desenvolvimento do câncer de mama aumenta quando há exposição do epitélio mamário à ação conjunta da prolactina e do estrógeno (CASSALI et al., 2004; CASSALI et al., 2014; MISDORP, 2002).

Tumores mamários cuja indução seja hormonal tendem a se tornar autônomos. Essa autonomia, fase final desse tipo de carcinogênese, é característica comum aos tumores hormônios-dependentes. Quando essa fase ocorre, morfológicamente já houve perda das características de diferenciação celular linhagem de origem (CASSALI et al., 2004).

Na mulher, o câncer de mama tem sido associado aos desequilíbrios endócrinos decorrentes dos cistos foliculares e do corpo lúteo persistente, além de fatores como pseudogestação, nuliparidade, obesidade e utilização de anticoncepcionais à base de progestágenos (MOL et al, 1997). Em cadelas, a nuliparidade ou fêmeas com pequeno número de partos têm maior predisposição de tumor de mama quando comparadas com animais que tiveram várias crias. Entretanto outros autores afirmam que estes fatores não são significativos para a carcinogênese mamária (MORRISON, 1998).

Na mulher, durante o primeiro trimestre da gestação há o aumento progressivo dos níveis de estrógeno, que aumentam com a continuidade da gestação. As globulinas transportadoras dos esteróides sexuais são responsáveis pela redução da concentração plasmática de estrógeno livre, protegendo a glândula mamária das ações desse hormônio. Mas esse efeito protetor somente é observado em mulheres com gestação completa (HENDERSON *et al.*, 1988). Em cadelas, esse efeito protetor da prenhez não é observado (RUTTEMAN *et al.*, 2001).

2.4 Diagnóstico

Para a avaliação clínica de cadelas com tumores mamários é indispensável o histórico clínico detalhado, o exame físico completo, hemograma, perfil bioquímico, radiografias torácicas, ultrassonografia e ainda, quando indicada, tomografia (JASCKSTET, 2013). Além disso, as características macroscópicas como o tamanho, tempo de crescimento e evolução, ulceração, aderência à pele e tecidos subjacentes, são critérios que podem sugerir malignidade ou benignidade da neoplasia (MISDORP, 2002).

O diagnóstico histopatológico fornece características detalhadas quanto a microscopia do tumor (FERREIRA *et al.*, 2003), todavia as características histopatológicas identificadas na amostra revelam a variabilidade do comportamento biológico dentro do mesmo tumor. Na tentativa de predizer o comportamento da lesão utiliza-se de métodos como TNM (tamanho do tumor, comprometimento de linfonodos e a presença de metástases), além o uso de marcadores moleculares que são ferramentas de diagnóstico e fatores prognósticos (ZUCCARI *et al.*, 2008).

O exame citológico realizado por meio de punção aspirativa por agulha fina (PAAF) é considerado método auxiliar ao diagnóstico, por isso, recomenda-se a punção aspirativa de tumores e linfonodos regionais para investigação de metástases assim como, exclusão de outros diagnósticos como lipoma ou mastocitoma (CASSALI *et al.*, 2009; MISDORP, 2002). Entretanto é considerado de difícil interpretação considerando que as neoplasias podem ter apresentação histológica diferente nos nódulos de um mesmo animal e às vezes até em partes diferentes do mesmo nódulo. Por isso, a análise de lâminas contendo aspirados

citológicos de tumores mamários requer conhecimento prévio de histologia (RUTTEMAN *et al.*, 2001).

A citologia de tumores mamários de cadelas pode contribuir, ainda, para o diagnóstico. Entretanto, casos em que ocorra inflamação no esfregaço, esta se mostra como um fator negativo para o diagnóstico, já que a inflamação pode mascarar a verdadeira etiologia neoplásica da massa, particularmente no diagnóstico diferencial com o carcinoma inflamatório (ZUCCARI *et al.*, 2001; SLEECKX *et al.*, 2011).

O carcinoma inflamatório é uma neoplasia mamária agressiva e caracteriza-se histologicamente pela presença de qualquer subtipo de carcinoma associado ou não à intensa reação inflamatória, com infiltração da derme e seus vasos linfáticos superficiais (CASSALI *et al.*, 2014). Apresenta o pior prognóstico de todas as neoplasias mamárias, pois a evolução é extremamente rápida e a sobrevida média de aproximadamente 60 dias após o diagnóstico, que é clínico e histopatológico. A citologia aspirativa ou por esfregaço pode ser útil, pois sugerem o diagnóstico (SLEECKX *et al.*, 2011),, porém para a confirmação é necessário biópsia incisional (CASSALI *et al.*, 2014).

O exame histopatológico é o método de eleição para o diagnóstico das neoplasias, tornando possível a identificação da morfologia das células neoplásicas. Fatores como o tipo e o grau histológico, necrose tumoral e invasão vascular são imprescindíveis para o estudo sobre o comportamento biológico do tumor (MISDORP, 2002; ZUCCARI *et al.*, 2008).

A classificação histológica dos tumores mamários, usada em medicina veterinária, ainda não é consensual. Para classificar histologicamente as neoplasias mamárias caninas, diferentes métodos de classificação são utilizados, na tentativa de prever o comportamento biológico da lesão (QUEIROGA E LOPES, 2002). Dentre os mais usados destaca-se a classificação Misdorp (2002), Goldschmidt (2010) e a mais recente, proposta por Cassali *et al.* (2014).

A biologia molecular é outra ferramenta utilizada no diagnóstico dos tumores mamários e prognóstico em cadelas. A expressão de determinadas moléculas nas neoplasias mamárias está diretamente relacionada à progressão da doença e permite categorizar os pacientes em diferentes grupos prognósticos (QUEIROGA et

al., 2010). A imunohistoquímica, utilizada rotineiramente no câncer de mama da mulher, é um método que permite identificar no tecido, a expressão de marcadores moleculares que oferecem informações sobre as características e comportamento do tumor, corroborando no diagnóstico e prognóstico da doença (HORTA *et al.*, 2012; ZUCCARI *et al.*, 2008).

2.5 Estadiamento ou Classificação clínica TNM

Os tumores mamários são classificados pelo sistema TNM (tumor-linfonodo-metástase), estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para tumores mamários caninos, que considera as características: tamanho do tumor primário (T), o envolvimento de linfonodos regionais (N) e a presença ou ausência de metástases à distância (M) (CASSALI *et al.*, 2011).

Essa classificação foi determinada, principalmente, para auxiliar o clínico a estabelecer um prognóstico e planejar a terapêutica mais adequada, podendo ainda avaliar melhor tratamento (PELETEIRO, 1994). O estadiamento dos tumores mamários deve ser realizado antes dos tratamentos cirúrgico e clínico (FELICIANO *et al.*, 2012).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu o TNM para tumores mamários caninos levando em consideração os fatores similares ao TNM humano. T é o diâmetro (T1 – menor que 3 cm; T2 – 3 a 5 cm e T3 – maior que 5 cm; N envolvimento linfonodal regional (N0 – ausente; N1 presente); e M metástase à distância (M0 – ausente e M1 presente). Após a avaliação destes fatores, os casos são classificados em estádios que variam de I a V estádios crescente de acordo com a gravidade da doença (CASSALI *et al.*, 2014; OWEN, 1980).

A identificação e biópsia do linfonodo sentinel, que recebe linfa de formação neoplásica, fornecem informações importantes para tratamento e prognóstico de câncer de mama humano (PEREIRA, 2005). A avaliação dos linfonodos em cadelas está diretamente relacionada à função de drenagem linfática dos linfonodos mamários, sendo portanto, necessária avaliação da drenagem linfática mamária (PEREIRA, 2005) e biópsia aspirativa dos linfonodos envolvidos (CASSALI *et al.*, 2011).

O estadiamento TMN juntamente com a investigação de invasão tecidual e vascular, o grau de diferenciação nuclear, o tipo histologicopatológico, o grau de malignidade, são indispensáveis, pois fornece informações importantes sobre o prognóstico e tratamento (MARQUES, 2013).

2.6 Ciclooxygenase 2 (Cox 2)

Dos marcadores moleculares comumente utilizados em tumores mamários caninos destacam-se a Ciclooxygenase-2 (Cox 2), Ki-67, p53, p63 e Capase-3. Destes, a Cox 2 apresenta-se como um marcador potencial para prognóstico para o tumor de mama em cadela, devido ao seu papel nos processos inflamatórios, que frequentemente acompanham as neoplasias (BERTAGNOLLI, 2006; De NARDI, 2007; CASSALI *et al.*, 2009).

Os produtos do metabolismo do ácido araquidônico compõem um conjunto de mediadores que modulam a resposta inflamatória e imunológica, que se originam da oxidação do ácido araquidônico, gerado pela ação da enzima fosfolipase A₂ nos fosfolipídios da membrana celular. A ação do sistema enzimático da ciclooxigenase sobre os fosfolipídios de membrana converte o ácido araquidônico em prostaglandina estável (PGG₂), e reduzida para PGH₂. Esta então pode ser usada para sintetizar várias prostaglandinas, como a PGE₂, PGD₂ e PGF₂ (QUEIROGA *et al.*, 2005).

Há dois tipos de ciclooxigenases: ciclooxigenase 1 (Cox 1) e ciclooxigenase-2 (Cox 2) exercendo diferentes funções fisiológicas no organismo. Cox 1 é responsável na produção de prostaglandinas que modulam as funções fisiológicas em rins, trato gastrintestinal e em células como as plaquetas (ACKERMANN, 2013).

A Cox 2 não é diagnosticada na maioria dos tecidos. A expressão dessa molécula depende de estímulos específicos como a presença de citocinas (interleucina-1 e fator de necrose tumoral), fatores de crescimento (fator de crescimento epidermal – EGF e fator de crescimento de fibroblastos - FGF), lipopolissacarídeo bacteriano e oncogenes. A Cox 2 está presente fisiologicamente, de forma limitada, no cérebro, medula espinhal e pode estar envolvida na transmissão nervosa, particularmente na dor e febre (ACKERMANN, 2013).

A expressão de Cox 2 é frequentemente observada no citoplasma das células neoplásicas da mama e está relacionada à progressão tumoral, sendo considerado fator de prognóstico ruim para vários tipos histológicos (DORÉ, 2011; HORTA *et al.*, 2012). A alta expressão de Cox 2 está relacionada com malignidade, alta capacidade de proliferação das células neoplásicas, neovascularização e baixa taxa de apoptose, fatores relacionados com o aumento do potencial metastático das células tumorais (CASSALI *et al.*, 2009).

Condições celulares como hipóxia e a expressão de citocinas (interleucina 6), oncogenes (ras) e o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) tendem a aumentar a expressão de Cox 2, ajudando a promover a angiogênese e a invasividade do tumor (LAVALLE *et al.*, 2009).

A expressão de Cox 2 é superior nas neoplasias malignas mamárias em relação às benignas ou displasias (De NARDI, 2007; QUEIROGA *et al.*, 2010). Além disso, os níveis de COX 2 estariam correlacionados com características de parâmetros clínicos de malignidade, como tamanho grande do tumor, ulceração, aderência à pele, aderência a tecidos subjacentes e tipos histológicos mais agressivos (carcinoma sólido e carcinossarcoma) (QUEIROGA *et al.*, 2010).

A alta expressão de Cox 2 influencia na sobrevida, que é reduzida em cães com tumores malignos mamários (LAVALLE *et al.*, 2009; QUEIROGA *et al.*, 2010). Tumores de mama pouco diferenciados a indiferenciados expressam Cox 2 com maior intensidade quando comparados com os tumores mais diferenciados. (HELLER *et al.*, 2005).

A Cox 2 é altamente expressa em tumores de cólon e reto, enquanto que áreas normais de mucosa intestinal possuíam baixas ou nenhuma expressão para a Cox 2. Estas descobertas lideram a hipótese que a Cox 2 pode estar envolvida na determinação do crescimento e progressão do câncer de cólon (FELIN *et al.*, 2008).

A maioria dos antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) inibe as Cox-1 e Cox 2, enquanto que os Coxibes, que constituem uma nova geração de AINEs, são inibidores seletivos de Cox 2. Os AINEs seletivos para Cox 2 têm sido utilizados no controle da inflamação, evitando os efeitos adversos sobre o trato gastrintestinal causado pela inibição da Cox-1. Os inibidores de Cox 2, como o FiroCoxib®, podem ser utilizados como terapia adjuvante em tumores mamários malignos, uma vez que

mais de 50% desses tumores expressam essa enzima. A utilização desse medicamento associado a outras terapias pode ser benéfica em cadelas que apresentem tumores com alto grau de malignidade (ELSTON, 2012).

2.7 Tratamento

As opções de tratamento dependem do estágio de desenvolvimento do tumor, do tipo histológico e estadiamento clínico. As terapias mais utilizadas incluem a excisão cirúrgica, quimioterapia, radioterapia, imunoterapia ou uma combinação desses tratamentos (GUIMARÃES, 2012).

A remoção cirúrgica completa, com amplas margens de segurança ainda é o tratamento de escolha, exceto para animais com diagnóstico de carcinoma inflamatório ou com a presença de metástases à distância (FELICIANO *et al.*, 2012). A excisão cirúrgica pode ser curativa em cães com o estágio mais brando da doença e nos tumores pequenos, não invasivos e nos carcinomas bem diferenciados. Cães com tumores grandes e de alto grau, com grande chance de desenvolver metástases podem se beneficiar de terapias adicionais como a quimioterapia (CASSALI *et al.*, 2011).

As opções cirúrgicas incluem nodulectomia, mamectomia, mastectomia total unilateral ou bilateral, removendo os linfonodos regionais de acordo com a localização da glândula acometida. A escolha da técnica dependerá do número de mamas afetadas, tamanho, localização, fixação à tecidos adjacentes e estado geral do animal (MARQUES, 2013).

A utilização de drogas quimioterápicas como modalidade terapêutica ainda está em crescimento no contexto dos tumores mamários caninos, devido a poucos estudos sobre, falta de resultados satisfatórios, elevado custo associado à heterogeneidade de tumores (LANA *et al.* 2007).

Drogas quimioterápicas associadas como a Ciclofosfamida, Doxorrubicina e o 5-Fluouracil (5-FU), além de Vincristina associada à Doxorrubicina podem ser empregadas como tratamento adjuvante, proporcionando uma resposta efetiva, por diminuir a incidência de metástases e contribuir na prevenção de recidivas. A quimioterapia é indicada conforme o grau histológico do tumor, sendo utilizada em

casos de tumores muito indiferenciados e na presença de êmbolos vasculares (CIRILLO, 2008).

A sobrevida no pós-operatório de cadelas com neoplasias mamárias está ligada à expressão da Cox 2 nos adenomas e carcinomas de prognóstico bom e ruim. Dessa forma, inibidores seletivos da ciclooxygenase-2 devem ser considerados na quimioprevenção dos tumores de mama, uma vez que resultados positivos já foram descritos (ALMEIDA *et al.*, 2001; ELSTON, 2012; SURH *et al.*, 2001).

A radioterapia, devido à escassez de estudos realizados, não é tão atrativa quanto à quimioterapia nos tumores mamários caninos (LANA *et al.*, 2009).

Assim como na mulher (PEROU *et al.*, 2000), a expressão de receptores de estrógeno e progesterona está relacionada a um melhor prognóstico dos pacientes caninos com carcinomas mamários (SORENMO, 2003). Entretanto, nas cadelas a administração de progestágenos induz o desenvolvimento de piometra. Por isso, a hormonioterapia é aconselhada somente em cadelas esterilizadas. A ovariosalpingohisterectomia ou o uso de inibidores de receptores de estrógeno, por meio de drogas antiestrogênicas, podem ser favoráveis para a sobrevida desses pacientes. Não obstante, a sobrevida é inferior a dois anos para a maioria dos cães com metástases em linfonodos (TAVARES *et al.*, 2010).

Por fim, a imunoterapia, que é ramo de muitos estudos. Ensaios já fazem utilização de um vírus vacinal oncolítico (GLV-1h68) no tratamento de tumores mamários caninos. Esse vírus infectou e destruiu com sucesso, linhas celulares de adenoma mamário canino *in vitro*, inibiu a proliferação tumoral, diminuiu o tamanho da neoplasia e replicou-se em xenotransplante (GENTSCHEV *et al.*, 2009).

A aplicação de vacina autóloga de fusão de células dendríticas (células tumorais mamárias), em cães, também foi avaliada como possível tratamento. A administração dessas células em gânglios poplíteos de canídeos saudáveis conduziu a significativa produção de IgG, reconheceram抗ígenos de células tumorais em cultura, sem efeitos secundários (BIRD *et al.*, 2011).

Dada a complexidade no desenvolvimento do processo tumoral, as modalidades terapêuticas disponíveis devem ser constantes alvos de estudos e atualizações para tentar a preconização de tratamento (GUIMARÃES, 2012).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização desta pesquisa, a aprovação do Comitê de Ética de Utilização Animal da Universidade Federal de Uberlândia foi obtida sob o protocolo 082/14.

3.1 Cálculo da amostra

A amostragem é do tipo não probabilística, restrito aos elementos que se tem acesso. A amostra foi calculada pela fórmula, segundo Thrusfield, 2004:

$$n = (1,96)^2 \text{ P}_{\text{esp}} \times (1 - \text{P}_{\text{esp}}) / d^2$$

Nesta fórmula:

n: tamanho da amostra baseado em uma população infinita;

P_{esp}: prevalência esperada;

d: precisão absoluta esperada (erro).

Considerou-se a expressão da ciclooxigenase 2 nas mamas neoplásicas de cadelas como sendo, 50% positivo e 50% negativo, o erro de estimativa de 10% e a significância de 5%, determinou-se a amostra de 100 animais.

3.2 Amostras e critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídas neste trabalho, amostras de mamas diagnosticadas com neoplasias de cadelas encaminhadas voluntariamente pelos proprietários, no período de março a dezembro de 2014, para atendimento clínico cirúrgico veterinário no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia. Os critérios de inclusão foram que todos os animais fossem submetidos ao exame clínico detalhado, realização de raio-x simples de tórax para pesquisa de metástase pulmonar e mastectomia unilateral ou bilateral total. Sendo critério de exclusão, o uso prévio de drogas anti neoplásicas, anti-inflamatórios e antibióticos.

3.3 Avaliação das neoplasias mamárias

3.3.1 Dados dos animais e das neoplasias

Os dados epidemiológicos, sexo, raça e idade foram coletados, além das características do tumor, como tamanho, mensurado por meio de paquímetro, a consistência, aderência, ulceração, e localização.

3.3.2 Tamanho dos tumores mamários

As neoplasias foram agrupadas conforme a classificação TNM segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (OWEN, 1980); menores que 3 centímetros de diâmetro, de 3 a 5 centímetros de diâmetro e maiores que 5 centímetros de diâmetro.

3.3.3 Estadiamento clínico dos tumores mamários

O estadiamento clínico utilizado foi o sistema TNM segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (OWEN, 1980 modificado) que se baseia no tamanho do tumor primário (T), envolvimento neoplásico de linfonodos regionais (N) e a presença ou ausência de metástases à distância (M). Esta classificação estabelece como T, o tamanho em diâmetros do tumor (T1 – menor que 3 cm; T2 – 3 a 5 cm e T3 – maior que 5 cm; N envolvimento linfonodal regional diagnosticado por meio de citologia ou histologia (N0 – ausência de metástases; N1 – presença de metástases em linfonodo ipsilateral; N2 – presença de metástases em linfonodo bilateral); e M metástase à distância, verificado por meio de Raio X (tórax), exame clínico ou cirúrgico (M0 – ausente e M1 presente). Após a avaliação destes fatores, os casos foram classificados em estádios que variam de I a V graus crescente de acordo com a gravidade da doença (CASSALI *et al.*, 2014; OWEN, 1980).

Procedeu-se a avaliação clínica dos linfonodos (axilares e inguinais ipsilaterais e contralaterais) quanto ao tamanho, consistência e mobilidade. Para verificação do envolvimento de células neoplásicas neste órgão, coletou-se linfonodo inguinal que foi submetido ao exame histopatológico. E para a avaliação de metástases à distância, optou-se pelo exame radiográfico de tórax. Após

determinação do estadiamento clínico, o mesmo foi correlacionado com os tipos histológicos e a imunomarcação da Cox 2.

3.3.4 Histopatologia e classificação histológica dos tumores mamários

Amostras de mama (incluindo pele e subcutâneo) e linfonodos inguinais coletadas após exérese cirúrgica foram encaminhadas para o laboratório de Patologia Animal do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia.

As amostras foram fragmentadas e incluídas em formol tamponado a 10% por 48 horas (fixação), posteriormente, foram encaminhadas ao laboratório de Histopatologia Animal para o processamento histológico de rotina conforme Tolosa *et al.* (2003). O processamento consistiu em etapas de desidratação de álcool etílico em concentração crescente (70 a 99,5%), diafanização ouclareamento em xitol PA e inclusão em parafina líquida à aproximadamente 65°C. Após secagem, o bloco de parafina contendo o material biológico foi submetido a cortes de quatro micrômetros (μm) de espessura em micrótomo manual Leika®. Em seguida, após secagem em estufa à aproximadamente 40°C por no mínimo duas horas, foram coradas em hematoxilina e eosina e analisadas em microscópio Olegan® utilizando objetiva de 40x.

O diagnóstico histopatológico foi atribuído por dois patologistas após verificação de lesões em lâminas coradas em hematoxilina e eosina (HE). Os achados microscópicos foram avaliados e a classificação histológica das neoplasias foi determinada conforme Misdorp *et al.* (2002).

Os carcinomas foram subdivididos em dois grupos: simples (tubulopapilar, sólido e anaplásico) e complexos e foram correlacionados com o estadiamento clínico e a imunomarcação de Cox 2, assim como os tumores mamários benignos e malignos. Os tipos de carcinomas também foram correlacionados individualmente com a imunomarcação de Cox.

Para a atribuição do grau histológico de malignidade, três parâmetros foram avaliados: a percentagem do tumor com organização tubular, o pleomorfismo nuclear e o índice mitótico, de acordo com Elston e Ellis (1998). O grau histológico dos carcinomas foi correlacionado com a imunomarcação de Cox 2.

3.3.5 Imunohistoquímica

O processo de imunohistoquímica foi realizado conforme Nowak et al. (2005). Para a preparação das lâminas de vidro, com uma pipeta de Pasteur, foi aplicada uma gota de poli-L-lisina não diluída na extremidade da lâmina. Com o auxílio de outra lâmina em um ângulo de aproximadamente 45º, fez-se um esfregaço da poli-L-lisina, espalhando-a por toda superfície da lâmina. As lâminas contendo poli-L-lisina foram submetidas à secagem em temperatura ambiente (25ºC). O material biológico já incluso em parafina foi submetido à corte histológico em micrótomo na espessura de quatro µm e acondicionados em estufa a 45ºC por aproximadamente 24 horas.

Os cortes foram colocados sob as lâminas previamente preparadas e então submetidas à diafanização por 20 minutos em xilol PA. A desidratação dos cortes foi realizada em álcool 99,5% e 95% por seis minutos cada um. Por fim, as lâminas foram lavadas em água corrente por 10 minutos.

A recuperação antigênica por calor foi realizada em banho maria a 96ºC em solução ácido etilenodiamino tetra-acético dissódico (EDTA) 10 mM, pH 9. O pH da solução de EDTA foi ajustado com solução de hidróxido de sódio 3 molar com auxílio de pHmetro Hanna®. A solução EDTA foi pré aquecida no banho maria até atingir 96ºC, em seguida, as lâminas foram introduzidas, onde permaneceram em fervura por 40 minutos (RODRIGUES, 2007). Em seguida, as lâminas foram mantidas à temperatura ambiente (25ºC) por 20 minutos para resfriamento. Após resfriamento, as lâminas foram lavadas em solução 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol (Tris-HCl) e os cortes foram contornados com caneta hidrofóbica (DAKO S200230). Para o bloqueio das proteínas inespecíficas utilizou-se Protein Block (DAKO X0909), uma gota por corte, por 30 minutos. Em seguida as lâminas foram lavadas com Tris-HCl.

O anticorpo anti Cox 2 (N-20: sc-1746 - Santa Cruz) foi diluído 1:50 (conforme recomendações do fabricante) em soro albumina bovina (BSA) 1%. Os cortes receberam cada um, 100 microlitros (μ l) de anticorpos e posteriormente, cobertos com parafilm American National Can®. As lâminas foram incubadas 18 horas (overnight), 4ºC em câmara úmida. Como controle positivo da reação, utilizou-se cortes histológicos de adenocarcinoma de cólon de humano (FELIN et al., 2008).

Para controle negativo, substitui-se no corte histológico de intestino, o anticorpo primário por BSA.

Para bloqueio das peroxidases endógenas, inicialmente as lâminas foram lavadas com Tris-HCl e incubadas em peróxido de hidrogênio 15% (85 ml de álcool metanol e 15 ml de água oxigenada 30v) por 30 minutos, protegidas de luz ambiente. Posteriormente lavadas em água destilada e Tris-HCl. Novamente os cortes histológicos foram delimitados com a caneta hidrofóbica.

Foi utilizada a técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase (DAKO, K069011 - LSAB + HRP (rabbit/mouse/goat) e a reação foi revelada com diaminobenzina (DAKO-K3468, DAB). As lâminas foram contra coradas com Hematoxilina de Harris por 3 minutos e montadas com lamínulas e Entellan®.

3.3.6 Avaliação de lâminas de imunohistoquímica

A análise semi quantitativa das lâminas de imunohistoquímica foi determinada conforme Cassali *et al.* (2009) e Queiroga *et al.* (2010). Foi considerada como uma reação positiva, a presença de distinto rotulagem marrom no citoplasma das células epiteliais neoplásicas. A imunorreatividade foi avaliada por dois observadores que analisaram a lâmina em aumento de 200x, usando o método de pontuação de IHQ, que consiste em estimativas da percentagem de células positivas e a intensidade de marcação. Quanto à distribuição percentual, 10 campos foram contados e em cada campo a percentagem de células positivas foi pontuada sendo 0 (0% de células positivas), 1 (<10% de células positivas), 2 (10-50% de células positivas), 3 (51-80% positiva células) ou 4 (> 80%). A intensidade da coloração, dada por observação, foi pontuada como 0 (negativo), 1 (fraca), 2 (moderada), ou 3 (forte), baseado na intensidade de marcação do controle positivo da reação.

O escore final foi obtido pelo produto de número de células marcadas e a intensidade, resultando em um valor entre 0 a 12. Definiu-se o ponto de corte pelo valor médio 6, sendo os tumores com escore final de 0 a 6 (≤ 6), considerados com marcação fraca para Cox enquanto, aqueles com escore de 7 a 12 (> 6), imunomarcação forte.

3.4 Análises estatísticas

Para verificação da correlação de expressão da Cox 2 de acordo com o tipo histológico (tumores benignos e malignos, carcinomas simples e complexos e os tipos de carcinomas mamários) com o escore na imunohistoquímica utilizou-se o teste Qui-quadrado ($p<0,05$) no programa Action 2.5, Microsoft Excel 2007.

Ainda, utilizou-se o teste Qui-quadrado ($p<0,05$) no programa Action 2.5, Microsoft Excel 2007 para a correlação dos grupos e tipos de carcinomas com o TNM, grau de malignidade e o escore de marcação na IHQ.

Avaliou-se ainda, isoladamente, por meio do teste de Qui-quadrado, as características como tamanho tumoral e metástase regional com o escore de marcação na IHQ. Por fim, utilizou-se o teste de Mann Whitney para verificar a relação entre a gradação dos carcinomas e o escore de marcação de Cox.

4 RESULTADOS

Foram selecionadas 100 cadelas com tumores mamários, com idade variando entre quatro e 17 anos. Neste trabalho, a idade média das cadelas com tumor de mama foi de 10,03 ($\pm 2,84$) anos com maior distribuição dos pacientes entre oito e 13 anos (Figura 1).

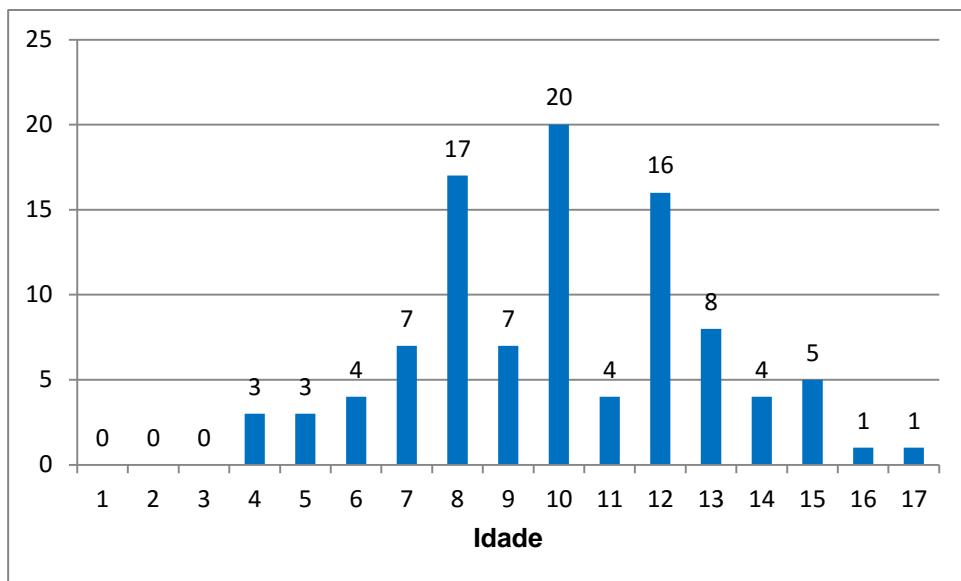


Figura 1. Frequência de cadelas com neoplasias mamárias de acordo com a idade, Uberlândia, MG, 2015.

Das 100 cadelas avaliadas 41 (41%) apresentaram mais de uma mama com neoplasia, totalizando 164 mamas avaliadas. Com relação à distribuição dos nódulos mamários, 64 (39,02%) apresentaram-se nas mamas inguinais, 33 (20,12%) nas abdominais caudais, 29 (17,69%) nas glândulas abdominais craniais, 25 (15,24%) nas mamas torácicas caudais e por fim, 13 (7,93%) nas mamas torácicas craniais.

Quanto ao tamanho, do total de 164 nódulos, 94 (57,32%) eram menores que três centímetros de diâmetro, sendo esse o tamanho mais frequente. Trinta e nove (23,78%) nódulos possuíam tamanho entre três a cinco centímetros e 31 (18,90%) com diâmetro maior que cinco centímetros.

Na avaliação do estadiamento clínico, somente 43 (43%) das 100 cadelas puderam ser avaliadas. Foram excluídas da avaliação do estadiamento 50 (50%)

cadelas devido ao diagnóstico inconclusivo do Raio X ou exame de linfonodo, cinco (5%) animais apresentaram diagnóstico histológico benigno e 2 (2%) cadelas com lesões não neoplásicas.

O grau de estadiamento mais frequente foi o I os menos frequente III, IV e V (Figura 2).

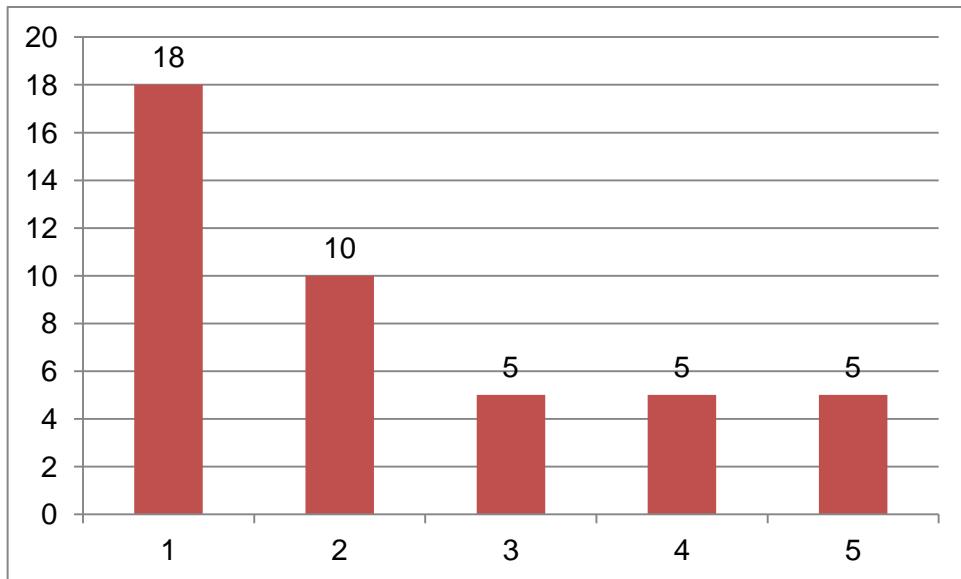


Figura 2. Frequência de cadelas com neoplasias mamárias de acordo com estadiamento clínico – TNM, Uberlândia, MG, 2015.

Das 100 cadelas avaliadas 41 (41%) apresentaram mais de uma mama com neoplasia e, destas, 18 (43,90%) possuíam nódulos com o mesmo tipo histológico. As demais 23 (56,10%) cadelas apresentavam nódulos com tipos histológicos diferentes.

O total de 131 amostras de neoplasias mamárias foi avaliado, sendo que 11/100 (11%) cadelas apresentaram tumores mamários benignos e malignos concomitantemente e nove (9%) cadelas apresentaram mais de um tipo de carcinoma mamário. Com relação ao comportamento tumoral, 16 amostras das 131 estudadas (12,21%) foram diagnosticadas como neoplasias benignas, 108 (82,44%) malignas e sete (5,34%) amostras eram lesões não neoplásicas (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação histológica e frequência das lesões mamárias observadas em cadelas, Uberlândia, MG, 2015.

| Lesões não neoplásicas | n |
|--------------------------------------|------------|
| Inflamação | 5 |
| Hiperplasia lobular | 2 |
| Tumores benignos | n |
| Adenoma simples | 7 |
| Fibroadenoma | 6 |
| Tumor misto benigno | 4 |
| Tumores malignos- Carcinomas | n |
| Carcinoma <i>in situ</i> | 2 |
| <u>Carcinomas Simples</u> | |
| Carcinoma tubulopapilar | 38 |
| Carcinoma sólido | 12 |
| Carcinoma anaplásico | 1 |
| <u>Carcinoma complexo</u> | 46 |
| Tipos especiais de Carcinomas | n |
| Carcinoma com diferenciação escamosa | 3 |
| Sarcomas | n |
| Carcinossarcoma | 1 |
| Fibrossarcoma | 2 |
| Hemangiossarcoma | 1 |
| Osteossarcoma | 1 |
| Total | 131 |

Classificação conforme Misdorp *et al.* (2002).

A inflamação foi a lesão não neoplásica mais frequente diagnosticada nas mamas, observada em cinco amostras (3,82%). Das neoplasias benignas (n=16), sete (43,75%) foram identificadas como adenoma (Figura 3A). Das neoplasias mamárias malignas (n=108), os carcinomas complexos foram diagnosticados em 46 (42,60%) amostras (Figura 3B) e os carcinomas simples em 51 (47,22%). Dentre os carcinomas simples, o carcinoma tubulopapilar foi o mais frequente, diagnosticado

em 38 (74,50%) amostras, seguido do carcinoma sólido, identificado em 12 (23,53%) mamas. (Tabela 1). Uma cadela (1%) foi diagnosticada com carcinoma inflamatório e concomitantemente, carcinoma complexo.

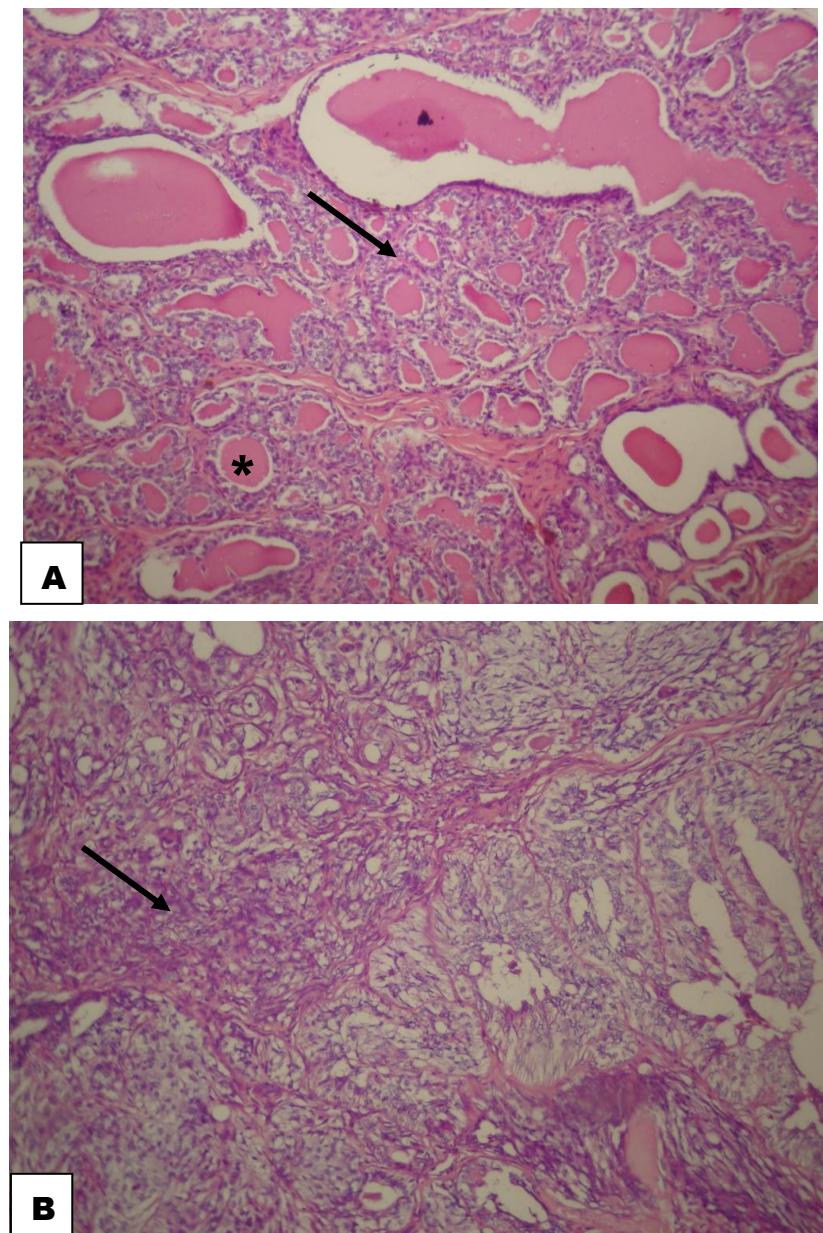


Figura 3. A. Fotomicrografia de adenoma mamário de cadela. Notar proliferação de células epiteliais benignas formando túbulos (seta), com conteúdo róseo vítreo no interior (*), aumento de 40x, hematoxilina e eosina (HE) **B.** Fotomicrografia de carcinoma complexo mamário de cadela. Notar proliferação de células epiteliais e mioepiteliais desordenadas (seta) e pouca formação tubular, aumento de 40x, HE.

O grau histopatológico foi atribuído aos carcinomas (n=99), exceto o carcinoma *in situ* (n=2), sendo que 37 (38,14%) neoplasias eram de grau I, as neoplasias de grau II foram identificadas em 50 amostras (51,55%) e apenas 10 (10,31%) tumores foram classificados como grau III (Tabela 2).

Tabela 2. Frequência de carcinomas mamários de cadelas de acordo com o grau histológico, Uberlândia, MG, 2015.

| Histopatológico | Grau | | | Total |
|-------------------------|-------------|-----------|-----------|--------------|
| | 1 | 2 | 3 | |
| Carcinoma tubulopapilar | 17 | 19 | 2 | 38 |
| Carcinoma sólido | 2 | 5 | 5 | 12 |
| Carcinoma anaplásico | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Carcinoma complexo | 18 | 26 | 2 | 46 |
| Total | 37 | 50 | 10 | 97 |

Os dados do estadiamento clínico (TNM) foram correlacionados com a classificação histológica das neoplasias malignas. Três (6,98%) cadelas das 43 que foram estadiadas apresentaram dois tipos de neoplasias malignas concomitantemente, sendo considerado para o TNM, o tipo histológico de pior prognóstico segundo Misdorp *et al.* (2002). O estadiamento em graus I e II foi mais frequente para os carcinomas, observado em 17 (39,54%) e nove (20,93%) animais respectivamente, e cinco (11,63%) cadelas com carcinoma mamário foram estadiadas em grau V (Tabela 3).

Tabela 3. Frequência de cadelas com neoplasias mamárias malignas e classificação TNM, Uberlândia, MG, 2015.

| Histopatológico | TNM | | | | | Total |
|--------------------------|------------|-----------|----------|----------|----------|--------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| Carcinoma inflamatório | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| Carcinoma <i>in situ</i> | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Carcinoma tubulopapilar | 10 | 2 | 1 | 1 | 3 | 17 |
| Carcinoma sólido | 2 | 1 | 0 | 1 | 0 | 4 |
| Carcinoma complexo | 4 | 6 | 3 | 2 | 2 | 17 |
| Carcinomassarcoma | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Fibrossarcoma | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| Osteossarcoma | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Total | 18 | 10 | 5 | 5 | 5 | 43 |

A caracterização da imunoexpressão de ciclooxygenase 2 (Cox 2) foi realizada e verificou-se que nos tumores mamários caninos a imunomarcação tem distribuição focal ou difusa com intensidade variável (fraca, moderada ou intensa) e a média de células marcadas nas neoplasias benignas, malignas e não lesões neoplásicas foi de 1,70/campo. A imunoexpressão se restringiu ao componente epitelial da glândula mamária. Nenhuma imunomarcação foi observada no componente mesenquimal, representado pelas células mioepiteliais contráteis, fibroblastos ou tecido conjuntivo.

Dos 131 amostras analisadas, 37 (28,24%) não apresentaram células imunomarcadas e 94 (71,76%) apresentaram marcação positiva. Destas 94 amostras com marcação positiva, cinco (5,32%) eram lesões não neoplásicas e 89 (94,68%) neoplasias, sendo 12 (13,48%) benignas e 77 (86,52%) malignas (Figura 4).

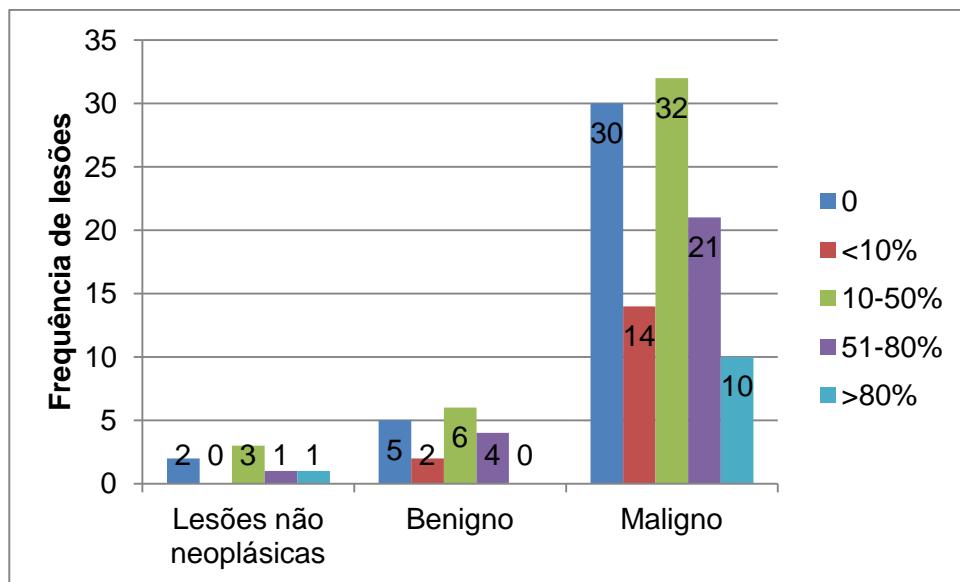


Figura 4. Frequência das lesões em mamas de cadelas de acordo com o percentual de células marcadas por Cox 2, Uberlândia, MG, 2015.

Somente as neoplasias malignas expressaram mais de 80% de células marcadas e a maior frequência de expressão foi entre 10 a 50%, observada em 32 (40,03%) amostras de 77 malignas que expressaram Cox 2. No entanto, não houve diferença entre a percentagem de células marcadas quando comparado tumores malignos e benignos ($p=0,90$). Macrófagos presentes em alguns carcinomas mamários expressaram fortemente Cox 2 e foi considerado como controle interno positivo.

Considerando a imunomarcação de Cox 2 em carcinomas ($n=99$) observou-se que 76 (76,76%) amostras foram positivas. Das amostras com imunomarcação ($n=76$), 14 (18,42%) apresentaram número de células marcadas menor que 10%, 31 (40,79%) entre 10 a 50%, 21 (27,63%) entre 51 a 80% e 10 (13,16%) mais de 80% de células marcadas.

Dentre os carcinomas com imunomarcação para Cox 2 ($n=76$), 35 (46,05%) eram carcinomas simples e 39 (51,32%) complexos e apenas dois (2,63%) carcinoma *in situ*. Dentre os carcinomas simples ($n=35$), 71,43% das amostras apresentaram de 10 a 80% de células imunomarcadas para Cox 2, enquanto 48,71% dos carcinomas complexos apresentaram entre 10 a 50% de células imunomarcadas ($p=0,04$) (Figura 5).

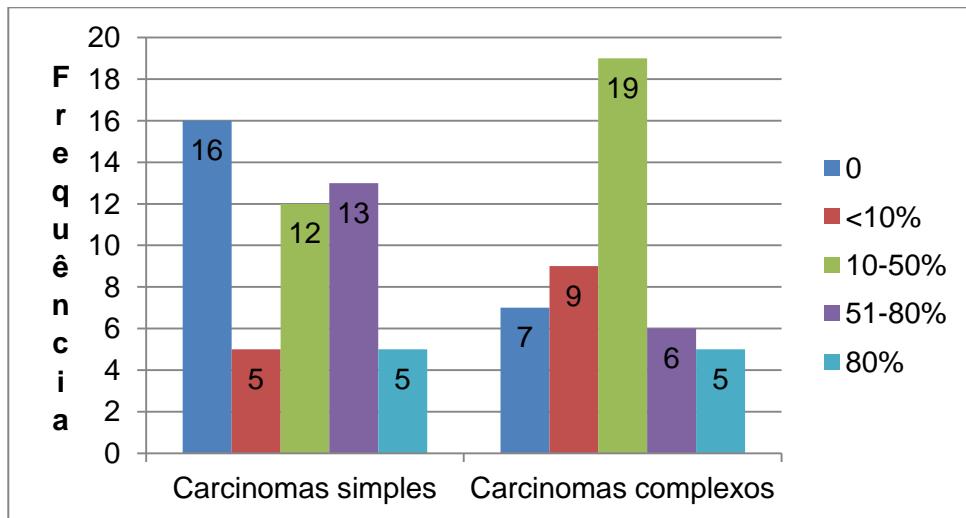


Figura 5. Frequência de amostras imunomarcadas por Cox 2 de acordo com o tipo de carcinoma mamário simples e complexo de cadelas e o percentual de marcação, Uberlândia, MG, 2015.

Quanto à imunomarcação celular de acordo com o tipo de carcinoma, 19 (41,30%) dos 46 carcinomas complexos e 10 (26,32%) dos 38 carcinomas tubulopapilares apresentaram frequência de 10 a 50% de células epiteliais neoplásicas marcadas (Figura 6). Enquanto nos carcinomas complexos nove (19,56%) do total de 46 amostras marcaram menos de 10% das células em detrimento dos carcinomas tubulopapilares, verificado em apenas três (7,89%) de 38 mamas. Nos carcinomas tubulopapilares 10 (26,32%) de 38 não apresentaram marcação enquanto nos carcinomas complexos, sete (15,21%) de 46 amostras. Por fim, 11 (28,95%) de 38 amostras de carcinomas tubulopapilares apresentaram de 51 a 80% de células marcadas (Figura 7A/B) e nos carcinomas complexos seis (13,04%) do total de 46. Não houve diferença com relação ao percentual de células marcadas comparando-se os tipos de carcinomas mamários ($p=0,15$).

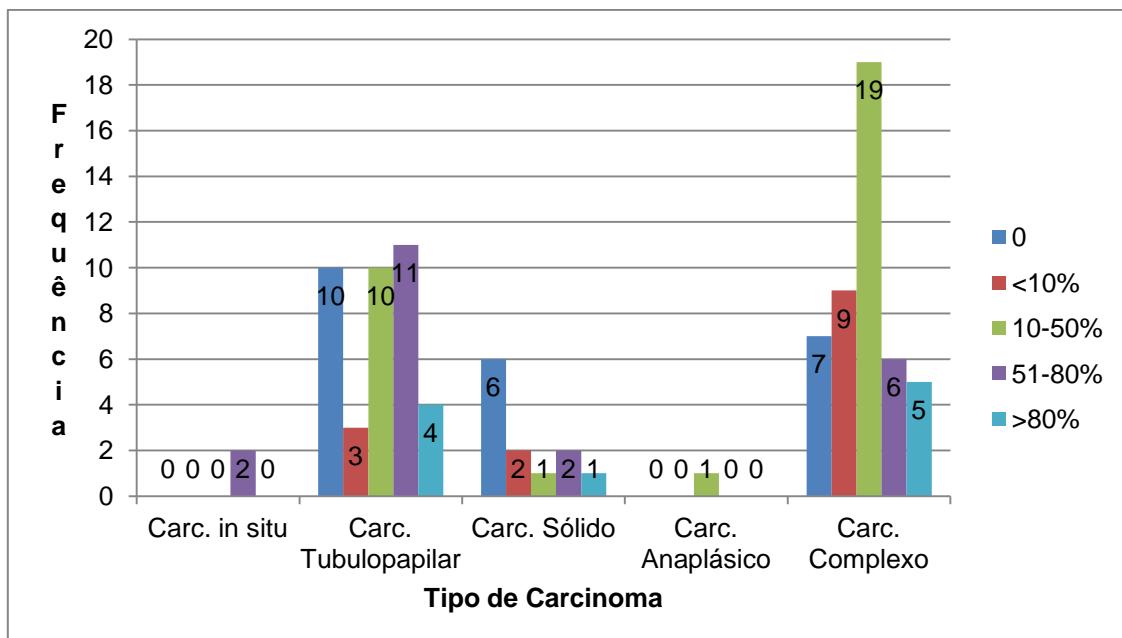


Figura 6. Frequência de amostras imunomarcadas por Cox 2 de acordo com o tipo de carcinoma mamário de cadelas e percentual de marcação, Uberlândia, MG, 2015.

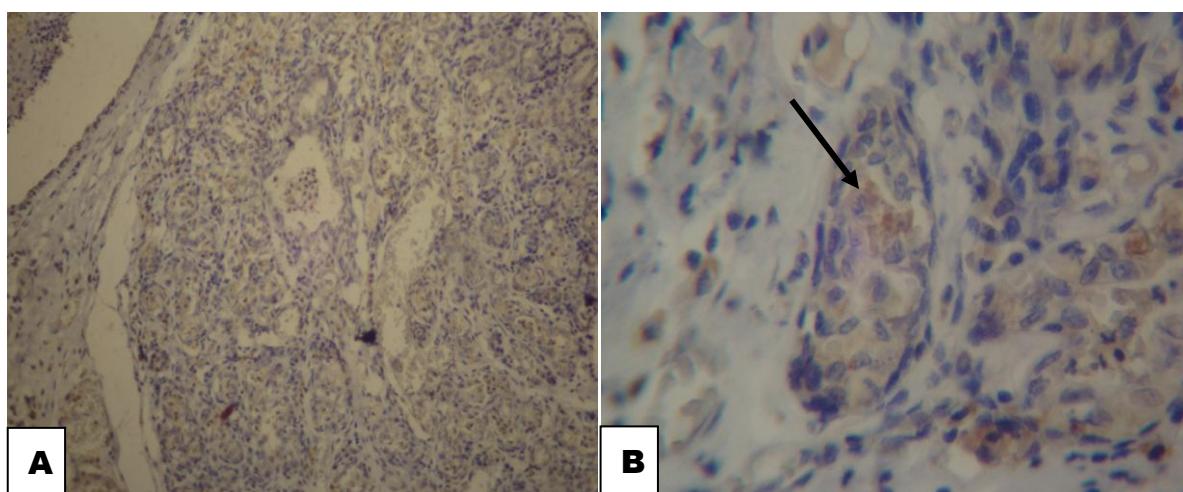


Figura 7. Fotomicrografia de carcinoma tubulopapilar em mama de cadela com imunomarcação para Cox 2 pela técnica de imunohistoquímica. **A.** Notar grupo de células epiteliais neoplásicas imunomarcadas, 100x, contra coloração, Hematoxilina de Harris. **B.** As células epiteliais apresentam citoplasma de coloração marrom (seta), indicando a presença de enzima Cox 2, 400x, contra coloração Hematoxilina de Harris.

Quanto à intensidade de marcação das células neoplásicas imunorreativas para Cox 2, cinco (41,67%) das neoplasias benignas (n=12) apresentaram intensidade de marcação fraca, três (25%) moderada e quatro (33,33%) intensidade forte. Enquanto as neoplasias malignas (n=77), 26 (33,77%) apresentaram intensidade de marcação fraca, 37 (48,05%) moderada e 14 (18,18%) tumores intensidade forte de marcação.

Quanto à intensidade de marcação dentro do grupo de carcinomas, a intensidade forte foi a menos frequente. E a intensidade moderada, a mais frequente com exceção do carcinoma *in situ*, carcinoma sólido e carcinoma anaplásico (Figura 8). Utilizando o teste de comparação de proporções comparou-se o número de tumores de cada tipo de carcinoma que expressaram intensidade moderada de imunomarcação e não houve diferença entre os diferentes tipos.

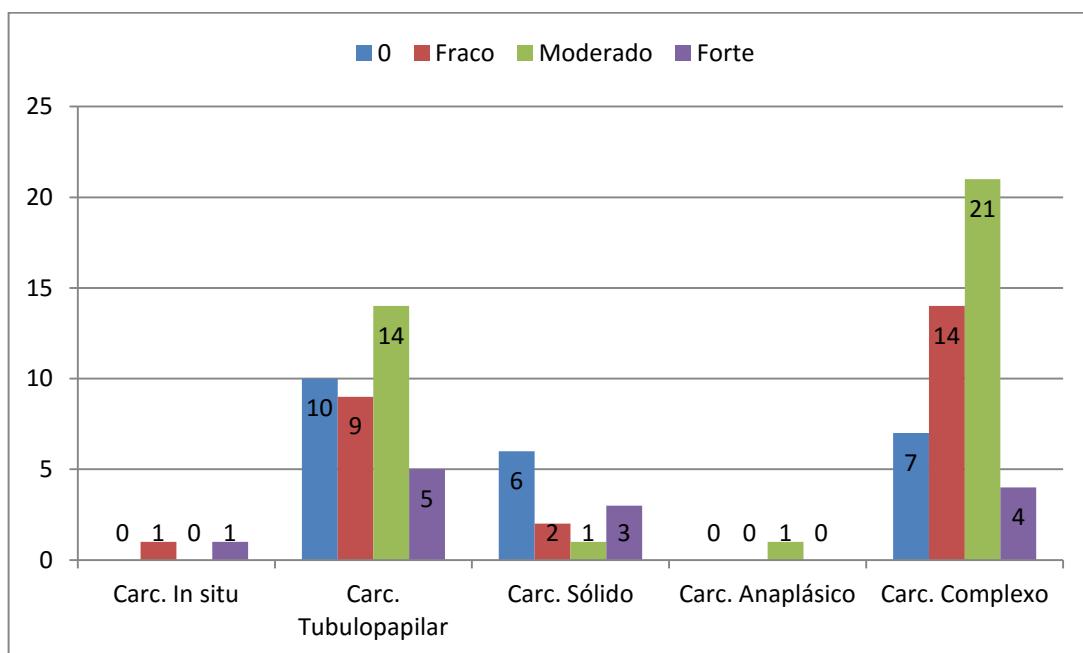


Figura 8. Frequência de tipos de carcinomas de acordo com a intensidade de marcação e Cox 2 nas células epiteliais mamárias de cadelas, Uberlândia, MG, 2015.

Considerando o escore de marcação, obtido pelo produto das células marcadas e a intensidade, foram definidos dois grupos: marcação fraca e forte. Das 131 amostras, 111 (84,73%) foram consideradas como de marcação fraca e 20

(15,27%) forte. Dentre as amostras de marcação fraca ($n=111$), 89 (80,18%) eram neoplasias malignas, enquanto 16 (14,41%) neoplasias benignas e seis (5,41%) lesões não neoplásicas. Aquelas amostras com marcação forte ($n=20$), 18 (90%) foram consideradas neoplasias malignas, uma (5%) benignas e uma (5%) lesão não neoplásica (Figura 9). Não houve correlação entre o escore de marcação e o comportamento tumoral ($p=0,50$).

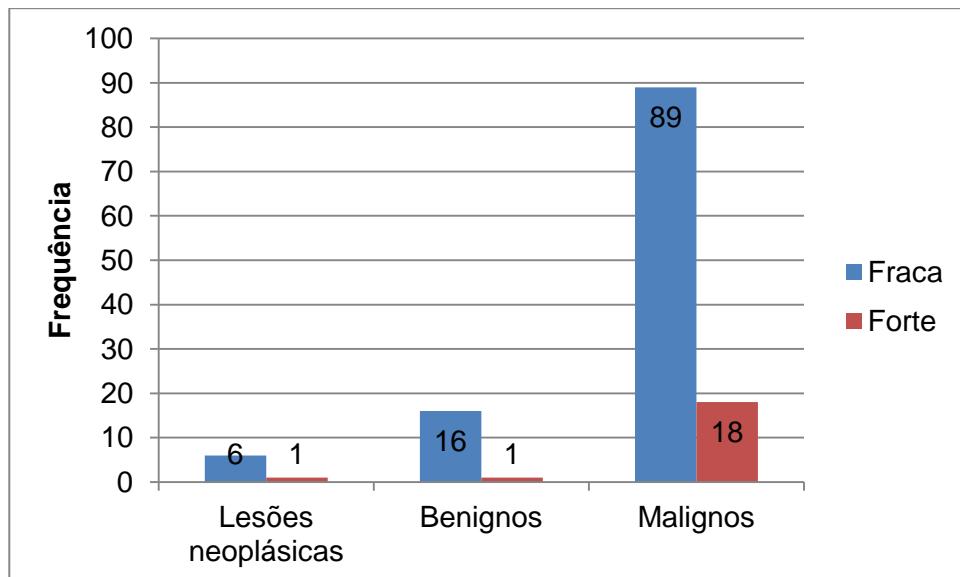


Figura 9. Frequência de amostras de mama de cadelas de acordo com o escore de imunomarcação e o comportamento tumoral, Uberlândia, MG, 2015.

A correlação do escore de imunomarcação (produto das células marcadas e a intensidade) com os tipos histológicos demonstrou que, com exceção do processo inflamatório, adenoma e carcinomas todas as outras lesões expressam fraca marcação para Cox 2. Não houve correlação entre o escore de marcação e os tipos de histológicos ($p=0,80$) (Figura 10).

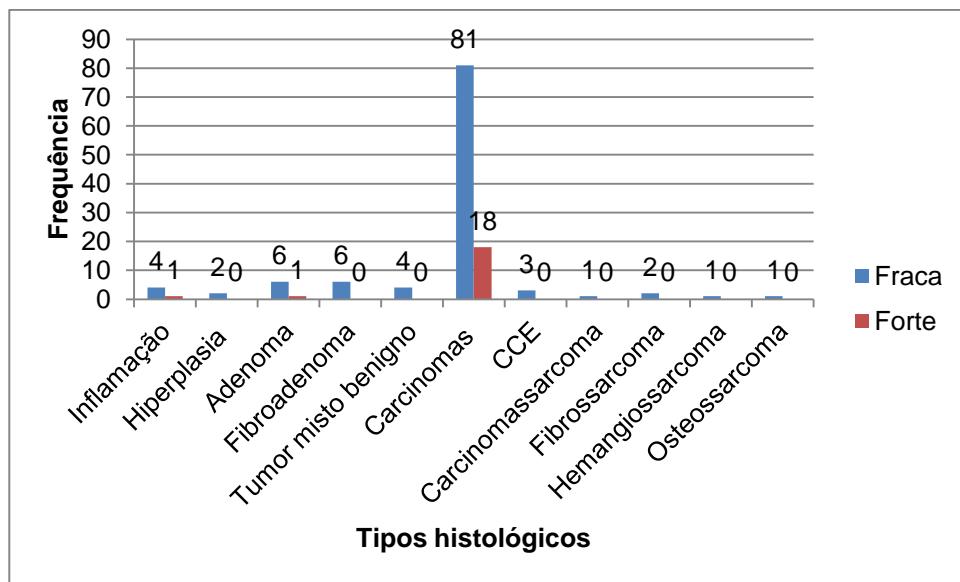


Figura 10. Frequência de tipos histológicos e escore de marcação de Cox 2 em amostras de mama de cadelas, Uberlândia, MG, 2015.

Ao correlacionar os tipos de carcinomas com o escore, a imunomarcação fraca foi mais frequente (Figura 11). Não houve correlação entre o escore de marcação e os tipos de carcinomas ($p=0,10$).

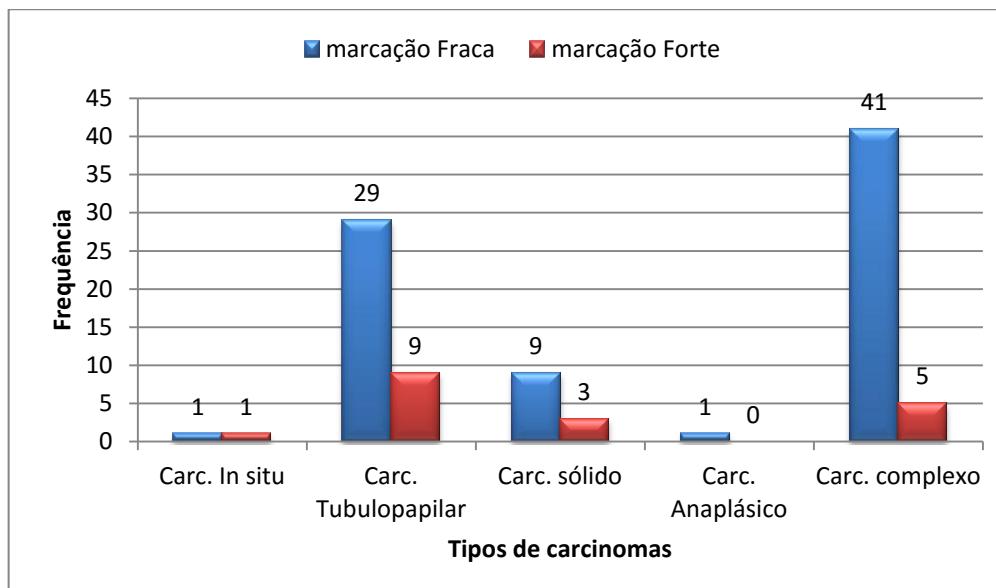


Figura 11. Frequência de tipos de carcinomas mamários de cadelas de acordo com escore de marcação, Uberlândia, MG, 2015.

Quanto à correlação da graduação histológica dos carcinomas e o escore de marcação de Cox, o escore fraco foi mais frequente ($n=80$) identificado em 31 (38,75%) amostras de carcinomas grau I, 39 (48,75%) grau II e 10 (12,5%) carcinomas grau III. Em relação ao escore forte ($n=17$), seis (35,29%) amostras eram carcinomas grau I, 11 (64,71%) grau II e nenhuma amostra do grau III apresentou escore forte de imunomarcação. Não houve relação entre o grau histológico dos carcinomas e o escore de marcação para Cox 2 ($p=0,24$).

Ao correlacionar o estadiamento clínico das cadelas ($n=43$) e o escore de imunomarcação para Cox 2, nenhuma cedula apresentou imunomarcação forte no estadiamento IV e V (Figura 12). Não houve correlação entre o escore de marcação e o TNM dos animais ($P=0,45$).

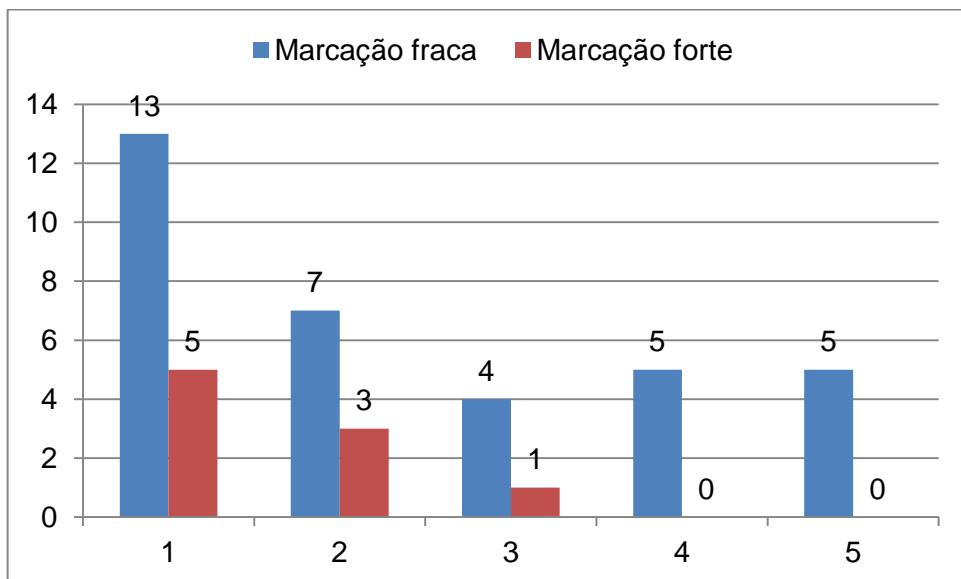


Figura 12. Frequência de cadelas de acordo com o TNM e escore de imunomarcação de Cox 2, Uberlândia, MG, 2015.

O tamanho e o envolvimento linfonodal de 43 cadelas incluídas no TNM foi correlacionados com a imunoexpressão de Cox 2. Quanto ao tamanho e o escore de imunomarcação, 34 (79,07%) cadelas apresentaram escore fraco, destas 14 (41,18%) apresentaram tamanho menor que três centímetros, 12 (35,29%) animais com nódulos de tamanho três a cinco centímetros e oito (23,53%) cadelas com tumores maiores que cinco centímetros. O escore de marcação forte foi identificado

em nove animais (20,93%), cinco (55,56%) cadelas tinham tumores com menos de três centímetros, três (33,33%) com tamanho de três a cinco centímetros e apenas uma (11,11%) cadela com nódulo maior que cinco centímetros. Não houve correlação entre o tamanho tumoral e o escore de marcação ($p=0,64$).

Quanto à presença de metástase em linfonodo e o escore de marcação de Cox 2, os animais com metástase em linfonodo ($n=8$), todos apresentaram imunomarcação fraca enquanto aqueles animais com ausência de metástase em linfonodo ($n=35$), 26 (74,29%) cadelas apresentaram imunomarcação fraca e nove (27,71%) apresentaram marcação forte para Cox 2. Não houve correlação entre o envolvimento de linfonodo e o escore de marcação para Cox 2 ($p=0,25$).

5 DISCUSSÃO

As neoplasias mamárias acometem principalmente cadelas adultas e idosas, com baixa incidência em animais menores que dois anos. As média de idade relatadas na literatura são 10,17 (TORIBIO, 2012), 10,2 (CASSALI *et al.*, 2009) e 10,6 (GUIMARÃES, 2012;), semelhante a observada nas cadelas desse estudo ($X=10,3$ anos). A idade é considerada como um fator de risco para neoplasias mamárias em cadelas e Sorenmo *et al.* (2011) verificaram que a média de idade dos animais com tumores benignos era inferior a média dos animais com tumores malignos.

Com relação à localização, no presente estudo as mamas inguinais, abdominais caudais e abdominais craniais foram as mais acometidas. As mamas inguinais e abdominais caudais são geralmente as mais acometidas, devido a maior quantidade de parênquima mamário, podendo sofrer maior alteração proliferativa em resposta aos hormônios (FELICIANO *et al.*, 2012; MISDORP, 2002).

A drenagem linfática, normalmente, ocorre para o linfonodo regional ipsilateral. Ainda há possibilidade de alteração da drenagem linfática para glândula ou linfonodo contralateral nos casos de neoplasias mamárias (PEREIRA *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2008). Entretanto na mama abdominal cranial essa drenagem é mista (linfonodo axilar e inguinal) (BRAGULLA e KÖNIG, 2004). Neste estudo, 20,56% dos nódulos ocorreram na mama abdominal cranial. Cadelas com essas mamas acometidas por neoplasias devem ser especialmente inspecionadas para investigação de alterações morfológicas tanto no linfonodo axilar como no inguinal.

O tamanho do tumor parece ter relação com a sobrevida. Philibert *et al.* (2003) demonstraram que cadelas cujos tumores tinham menos de 3 cm de diâmetro tiveram um tempo de sobrevida (média de 22 meses) maior em relação à cadelas com tumores superior a 3 cm de diâmetro (média 14 meses).

O tamanho tumoral é considerado um fator de prognóstico importante para cadelas (CASSALI *et al.*, 2011). Cadelas com tumores menores que três centímetros e sem envolvimento linfonodal também apresentam prognóstico melhor quando comparados com aquelas com neoplasias maiores e ou que já apresentam metástase para linfonodo (FERREIRA *et al.*, 2009).

O tamanho menor que três centímetros foi observado em 57,32% dos nódulos mamários das cadelas deste trabalho. Essa percentagem foi superior à aquela verificada por Ferreira *et al.* (2009) que relataram percentagem de 18%, enquanto Toríbio *et al.* (2012) encontraram percentagem de 20% de tumores. Por outro lado, todos os tumores mamários estudados por Millanta *et al.* (2006) apresentaram-se menores que três centímetros.

Tumores mamários estão entre os mais comuns processos neoplásicos em cadelas e mais de 50% deles são malignos (LAVALLE *et al.*, 2009). No presente trabalho, verificou-se 82,44% de neoplasias malignas. Entretanto, frequências maiores de neoplasias malignas são observadas, podendo a mesma variar de 63,93% a 84,51% (ZUCCARI *et al.*, 2002) e até mesmo 90,9% como observado por Toríbio *et al.* (2012) na Bahia. Esta maior frequência de tumores malignos mamários pode se correlacionar à carcinogênese. Em alguns casos, há uma progressão das lesões pré neoplásicas para tumores benignos e, finalmente, para neoplasias agressivas e invasivas (MISDORP, 2002; CASSALI *et al.*, 2004).

Neste estudo, os carcinomas mais frequentes foram carcinoma complexo, carcinoma tubulopapilar e carcinoma sólido. As características histopatológicas das neoplasias revelam diferentes comportamentos biológicos. Na mulher, assim como na cadelas, os carcinomas tubulares são mais invasores que outros carcinomas, devido à diferenciação celular. Histologicamente, a glândula mamária é do tipo túbulo-alveolar e ao se tornar neoplásica, as células modificam-se morfologicamente e tornam-se diferentes das células originais. Com a continuidade do processo neoplásico, as células passam a ser indiferenciadas, caracterizando a malignidade do tumor (MISDORP, 2002).

Os carcinomas simples foram mais frequentes neste trabalho verificado em 39% das amostras de mamas de cadelas com neoplasia. Karayannopoulou *et al.* (2005) também relataram carcinomas simples como mais frequentes, seguido de carcinoma em tumor misto e o carcinoma complexo. Ferreira *et al.* (2009) também encontraram carcinoma simples como o mais frequente seguido do tumor misto benigno. As neoplasias malignas de mama tem potencial metastático que é influenciado pelo tipo tumoral, diferenciação histológica e vários fatores prognósticos clínicos (SORENMO, 2003). Carcinoma *in situ* e adenocarcinomas tem os melhores

prognósticos e o carcinoma anaplásico e carcinoma inflamatório, têm piores prognósticos (MISDORP, 2002). Já o prognóstico para o tumor misto maligno é ruim e a maioria dos cães desenvolve metástase dentro do primeiro ano (BENJAMIN *et al.*, 1999).

O carcinoma complexo é um tipo histológico comum encontrado em mama de cadelas. Este é constituído pelo componente epitelial e também mioepitelial, ambos neoplásicos. O componente mioepitelial pode sofrer metaplasia escamosa ou ainda, se diferenciar formando cartilagem (MISDORP, 2002). Cassali *et al.* (2014) consideram a presença de matriz mixóide ou tecido cartilaginoso em mamas neoplásicas como carcinomas em tumor misto.

A classificação histológica dos tumores mamários, usada em medicina veterinária, ainda não é consensual, pois na tentativa de prever o comportamento biológico da lesão, diferentes métodos de classificação são utilizados (QUEIROGA E LOPES, 2002). Sendo assim torna-se difícil as comparações de resultados encontrados com a literatura.

No presente trabalho, 35,11% das amostras de mamas neoplásicas foram diagnosticadas como carcinoma complexo. Tumores mistos são frequentes e é incerto se surgem a partir de tecido mioepitelial neoplásico, há hipóteses que se desenvolvam a partir do tecido conjuntivo intralobular, ou a partir de tumor misto benigno pré-existente (MISDORP *et al.*, 2002). Essa transformação maligna dá origem aos carcinomas em tumores mistos “in situ”, ainda delimitados pelas células mioepiteliais, ou invasores, cuja progressão tumoral encontra-se mais avançada (BERTAGNOLLI *et al.*, 2009).

Além da classificação das lesões histopatológicas, é importante determinar a graduação das neoplasias (formação de túbulos, grau nuclear e contagem de mitoses) (ZUCCARI *et al.*, 2008), pois a graduação e o tipo histológico estão relacionados com o prognóstico (LAVALLE *et al.*, 2009). A maioria dos carcinomas no presente estudo apresentou grau II e somente 10,31% apresentou grau III. Karayannopoulou *et al.* (2005) verificaram que carcinomas complexos de graus I e II apresentaram bom prognóstico, enquanto carcinoma tubular grau III, pior prognóstico. Além disso, carcinomas diferenciados de grau I e II apresentaram sete vezes risco de morte, enquanto os carcinomas indiferenciados grau III, 21 vezes.

O carcinoma complexo que foi o tipo histológico mais frequente deste trabalho apresentou graduação II mais frequente. E somente duas (4,35%) amostras foram classificadas grau III. Mendes *et al.* (2007) ao comparar tipo histológico de tumores mamários e graduação observaram que o carcinoma complexo o mais frequente, apresentou com maior frequência grau de malignidade I e nenhuma amostra grau III, assim como Karayannopoulou *et al.* (2005).

O carcinoma tubulopapilar foi o segundo tumor mamário mais frequente neste estudo sendo que 50% desses tumores foram classificados grau II e 44,73% grau I. Esses dados são diferentes daqueles apresentados por Karayannopoulou *et al.* (2005) que verificaram que os carcinomas simples apresentaram com maior frequência (50,9%) grau III. Porem Mendes *et al.* (2007) evidenciaram nos carcinomas simples (tubulopapilar) uma maior apresentação do grau I (54,1%) e grau II (37,84%) remetendo que dentre os carcinomas simples, o tubulopapilar apresenta menor malignidade.

Dentre os diversos fatores prognósticos em tumores mamários caninos estão o tamanho tumoral, a condição dos linfonodos e o estadiamento do paciente. A prática combinada de estadiamento (TNM) e a avaliação das características histológicas é ferramenta útil para a determinação do prognóstico dos tumores mamários caninos (LAVALLE *et al.*, 2009). No presente estudo, 42,50% das cadelas com carcinomas mamários, foram estadiadas no grau I. Esses dados diferem de estudos de Toríbio *et al.* (2012) que identificaram apenas 27,7% das cadelas na classificação TNM grau I e 36,6% no grau II. Quanto ao envolvimento nodal 18,60% dos animais apresentaram metástase em linfonodos, diferindo de Oliveira Filho *et al.* (2010) que observaram 29,5% das cadelas com tumor maligno apresentando metástase para linfonodos.

Das cadelas com carcinoma complexo mamário, 76,47% estavam entre os graus I a III de TNM, ou seja, não apresentavam comprometimento linfonodal enquanto, 23,53% dos animais apresentaram grau IV e V. Quanto aos carcinomas tubulopapilares, 76,47% dos animais também estavam entre graus I e III e 23,53% no grau IV e V. O comprometimento dos linfonodos é considerado importante fator prognóstico, pois 85,7% dos cães com metástases em linfonodos apresentam sobrevida inferior a dois anos (KARAYANNOPOULOU *et al.*, 2005).

Oliveira *et al.* (2010) relataram que os tipos histológicos mais frequentes em metástases para linfonodos foram carcinoma simples (50%), carcinossarcoma (25%), tumor misto maligno (8,3%), carcinoma complexo (8,3%) e carcinoma em tumor misto (8,3%). Na literatura é relatado que os carcinomas simples apresentam maior risco de metástases, entretanto no presente trabalho esse fato não ocorreu, possivelmente relacionado ao fato da maioria dos nódulos mamários serem de menor tamanho, indicando precocidade no diagnóstico e tratamento cirúrgico das neoplasias mamárias.

A utilização de marcadores moleculares é uma prática importante na oncologia veterinária. Por meio da imunohistoquímica é possível detectá-los nas neoplasias e determinar prognóstico e tratamento (ZUCCARI *et al.* 2008). A ciclooxygenase 2 (Cox 2) é considerada um importante marcador molecular prognóstico relacionado com progressão tumoral, apesar do papel em tumores mamários de cadelas não estar bem estabelecido (QUEIROGA *et al.*, 2010). Neste estudo, a imunomarcação de Cox 2 se restringiu ao componente epitelial da glândula mamária. Marques (2013) observou imunorreatividade na membrana citoplasmática das células epiteliais neoplásicas, assim como nas células mioepiteliais. Porem este autor utilizou clone de anticorpos diferentes para expressão da Cox 2, reforçando a necessidade de padronização de técnicas em estudos imunohistoquímicos para neoplasias mamárias (PEÑA *et al.*, 2013).

Nos diversos estudos com Cox 2 em tumores mamários em cadelas verifica-se que a percentagem de imunomarcação é variável. Há referência de percentagens de positividade de 7,1% a 24% para tumores benignos e de 56% a 76,2% para tumores malignos (DORÉ *et al.*, 2003; HELLER *et al.*, 2005; QUEIROGA *et al.*, 2010). No presente trabalho verificou-se imunoexpressão para a Cox 2 em 71,75% das amostras dentre neoplasias benignas, malignas e lesões não neoplásicas. A marcação de macrófagos foi observada assim como Doré *et al.* (2003).

A expressão de Cox 2 tem relação com o prognóstico nos carcinomas mamários na mulher (QUEIROGA *et al.*, 2011). Provavelmente o mesmo acontece em cadelas, entretanto neste trabalho não houve diferença significativa entre amostras de neoplasias benignas ou malignas.

No presente estudo 76,77% dos carcinomas mamários imunoexpressaram Cox 2. Heller *et al.* (2005) observaram 56% de carcinomas mamários expressando Cox 2 enquanto Nowak *et al.* (2005) relataram 74%. Por outro lado, Millanta *et al.* (2006) e Queiroga *et al.* (2010), verificaram imunoexpressão de Cox 2 em 100% das amostras de carcinomas.

Não houve diferença entre a percentagem de células marcadas quando comparado tumores malignos e benignos, assim como observado por Queiroga *et al.* (2010). Porem Doré *et al.* (2003) relataram diferença no número de células marcadas para Cox 2 de adenomas e adenocarcinomas, sendo estes com maior número de células marcadas.

Com relação ao número de células marcadas, 31,31% dos carcinomas apresentaram entre 10 a 50% positivas, sendo o carcinoma complexo o mais frequente para esta percentagem. Este valor foi semelhante ao identificado por Guimarães (2012) que relatou 37,2% de neoplasias mamárias com 10 a 50% de células imunomarcadas para Cox, porem os carcinomas simples foram mais frequentes. Neste trabalho, 37,15% dos carcinomas simples expressam de 51 a 80% de células imunomarcadas, assim como Queiroga *et al.* (2010) que observaram 33,33% de carcinomas simples de cadelas com a mesma percentagem de células expressando Cox 2.

A intensidade de marcação positiva, identificada pela coloração marrom acastanhada granular citoplasmática das células neoplásicas, foi considerada moderada nos carcinomas mamários das cadelas do presente trabalho. Guimarães (2012) também verificou intensidade moderada de imunomarcação celular nos carcinomas mamários. Entretanto, a intensidade de coloração é variável de acordo malignidade da neoplasia (DORÉ *et al.*, 2003; HELLER *et al.*, 2005). Millanta *et al.* (2006) observaram que a intensidade de marcação é mais intensa nos tumores mais indiferenciados.

O escore de marcação fraco foi o mais frequente no presente trabalho, assim como observado por Doré *et al.* (2003) que identificaram 82,1% das amostras de carcinomas mamários com escore fraco. Não houve correlação entre o escore de marcação e o comportamento tumoral. Entretanto, neste estudo 90% das amostras com marcação forte eram neoplasias malignas.

Queiroga *et al.* (2010) observaram escore de marcação fraca em somente 29,63% das amostras e estes autores também não observaram associação entre o escore de marcação e o tipo histológico. A diferença de marcação nas células de acordo com o tipo histológico deve-se ao comportamento biológico de cada tumor (HELLER *et al.*, 2005; MARQUES, 2013). São possíveis ainda, diferenças nas marcações devido ao uso de diferentes anticorpos, técnicas de imunohistoquímica e à grande heterogeneidade dos tumores analisados (QUEIROGA *et al.*, 2010).

A gradação histológica assim como a imunomarcação de Cox 2 em tumores mamários de cadelas são considerados fatores de prognóstico (CASSALI *et al.*, 2009, KARAYANNOPOULOU *et al.*, 2005). Assim como no presente trabalho, Guimarães (2012) verificou que imunomarcação fraca para Cox é mais frequente principalmente nos carcinomas de grau I e II. Ao contrário de Guimarães (2012) que observou imunomarcação forte em 53,85% dos carcinomas grau III, os carcinomas grau III do presente trabalho não apresentaram marcação forte.

Ao contrário do esperado, não foi evidenciado marcação no único tumor diagnosticado como carcinoma inflamatório. Esperava-se identificar elevado número de células imunomarcadas, já que esse tipo é considerado muito agressivo (CASSALI *et al.*, 2014). No processo de progressão tumoral, as células podem perder a capacidade de sintetizar a Cox 2, assim como acontece, com a perda dos receptores de estrógeno e progesterona nos carcinoma mamário de prognóstico ruim (PELETEIRO, 1994).

Em trabalhos que também avaliam a imunomarcação de Cox 2 em neoplasias mamárias de cadelas, o tamanho mais frequente dos tumores foi menor que três centímetros (GUIMARÃES, 2012; MARQUES, 2013). Assim como no presente trabalho, Millanta *et al.* (2006) não observaram correlação entre a expressão de Cox 2 e o tamanho do tumor. Entretanto Cassali *et al.* (2009), Guimarães (2012) e Marques (2013) verificaram correlação positiva entre essas duas variáveis, ou seja, a expressão de Cox 2 aumentava de acordo com o tamanho do tumor.

Quanto à presença de metástase em linfonodo e o escore de marcação, os animais com metástase em linfonodo apresentaram imunomarcação fraca, entretanto Guimarães (2012) verificou com maior frequência a alta imunorreatividade de Cox 2 em animais com metástase linfonodal. Cassali *et al.* (2009) observaram a

correlação positiva entre a expressão de Cox 2 e o envolvimento linfonodal. Nos animais sem metástase em linfodo a imunomarcação fraca foi mais frequente, resultados semelhantes aos observados por Guimarães (2012) em que nesses casos há baixa expressão foi mais frequente.

Apesar dos estudos existentes, o papel da Cox 2 na progressão de carcinoma mamário canino precisa ser melhor elucidado. Além disso, deve-se investir na avaliação do benefício terapêutico de inibidores da Cox 2 como quimopreventivos.

6 CONCLUSÕES

Em cadelas, a imunomarcação de Cox 2 não demonstrou ser um bom fator de prognóstico, visto que o tipo histológico e a imunomarcação para Cox 2 não apresentam correlação, assim como o tamanho e o envolvimento linfonodal.

7 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, E. M. P.; PICHÉ, C.; SIROIS, J.; DORÉ, M. **Expression of cyclooxygenase in naturally occurring squamous cell carcinomas in dogs.** The Journal of Histochemistry e Cytochemistry, v. 49, p. 867-875, 2001.

ARTWOHL, M. *et al.* Modulation by leptin of proliferation and apoptosis in vascular endothelial cells. **International journal of obesity and related metabolic disorders.** v. 26, n.4, p.577-580, 2002

BENJAMIN, S.A.; LEE, A.C; SAUNDERS, W.J. Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles. **Veterinary Pathology**, v.36, n.5, p.423-436, 1999.

BERTAGNOLLI, A.C. **Expressão de p63 e p53 em tumores mamários mistos de cadelas.** 2006. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2006.

BIRD, R.C. *et al.* An autologous dendritic cell canine mammary tumor hybrid-cell fusion Vaccine. **Cancer Immunology Immunother**, v.60, n.1, p.87-97, 2011.

BRAGULLA, H.; KÖNIG, H.E. Glândula mamária nos animais domésticos (Mama). In: KÖNIG H.E., LIEBICH H.G. **Anatomia dos Animais Domésticos: Texto e atlas colorido.** Vol.2 – Órgãos e sistemas. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.335-343.

CONTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Neoplasia. In: ROBBINS. **Patologia estrutural e funcional.** 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p. 233-295.

CALAFA, J., WEYER, K., DAAMS, J.H. Feline malignant mammary tumours. III. Presence of C particles and intracisternal A particles and their relationship with feline leukemia virus. **International Journal of Cancer**, v. 20, p. 759-767, 1977.

CASSALI, G.D. et al. Expressão da COX 2 nos carcinomas mamários de cadelas. **Veterinaria em Foco**, Canoas, v. 6, n.2, p. 134-139, jan/jun 2009.

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

CASSALI, G.D.; ESTRELA-SILVA, A.; SERAKIDES, R. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. **Ciência Rural**, v. 34, n.2, p.625-633, 2004.

CIRILLO, J.V. Tratamento quimioterápico das neoplasias mamárias em cadelas e gatas. **Revista Instituto Ciências e Saúde**, v.26, n.3, p. 325-327, 2008.

CLEARY, M.P., GROSSMANN, M.E., RAY, A. Effect of obesity on breast cancer development. **Veterinary Pathology**. V.47. n.2, p.202-213, 2010.

DE NARDI, A.B. et al. **Expresión de la ciclooxygenasa-2 en los carcinomas mamarios caninos primarios metastásicos y no metastásicos**. Archivos de Medicina Veterinaria, Chile, v.45, p. 311-316, 2013.

DE NARDI, A.B. **Correlação da cicloxigenase-2 com Ki-67, p53 e Caspase-3 nas neoplasias de mama em cadelas**. 2007. 92 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, São Paulo, 2007.

DORÉ, M.; LANTHIER, I.; SIROIS, J. Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, Filadelfia, v. 40, n.2, p. 207-212, 2003.

ELSTON, C. W., ELLIS, I. O. Assessment of histological grade. ELSTON CW., ELLIS IO. Eds. Systemic Pathology. **The breast**. London: Churchill Livingstone, p. 365-84, 1998.

ELSTON, F. **Avaliação clínica e imunoistoquímica de tumores mamários em cadelas submetidas a tratamento com inibidor da ciclooxigenase-2 (firocoxibe)**. 2012. 68 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

FELICIANO, M.A.R. et al. Neoplasia mamária em cadelas – revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de Medicina Veterinária**, São Paulo, n.18, p. 1-4, 2012.

FELIN, C.R., et al. Expressão das Proteínas p53 E Cox 2 em Adenocarcinoma Intestinal e Mucosa Adjacente. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v.28, n.1, p.19-25, 2008.

FERREIRA, E. et al. The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 7, p.01-06, 2009.

FERREIRA, E.; BREGUNCI, G.C.; SCHMITT, F.C.; CASSALI, G.D. Protocol for the anatomopathological examination of canine mammary tumors. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 1, p., 2003.

GETTY, R., **Anatomia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, v.1, 5 ed., 2048p.

GENTSCHEV, I. Use of an oncolytic vaccinia virus for the treatment of canine breast cancer in nude mice: preclinical development of a therapeutic agent. **Cancer Gene Therapy**, v. 16, n. 4, p.320-328, 2009.

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

GUIMARÃES, M.J.G. **Pesquisa da interação entre a expressão do EGFR e da Cox 2 nos tumores de mama da cadela.** 2012. 83f. Dissertação (Mestrado). Universidade do Porto, 2012.

HELLER, D. A. *et al.* Cyclooxygenase-2 expression is associated with histologic tumor type in canine mammary carcinoma. **Veterinary Pathology**, Filadelfia, v. 42, p.776-780, 2005.

HENDERSON, B.E.; ROSS, R.K.; BERNSTEIN, L. Estrogens as a cause of human cancer. **Cancer Reserch**, v.48, p.246-253,1988.

HORTA, R.S. *et al.* Fatores prognósticos e preditivos dos tumores caninos definidos com auxílio da imuno-histoquímica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.6, p. 1033-1039, jun. 2012.

INTERNATIONAL Committee On Veterinary Gross Anatomical Nomenclature. **Nomina anatômica veterinária**. 5.ed. Knoxville: World Association on Veterinary Anatomist,. 160 p. 2012.

JASCKSTET, V. **Marcadores prognósticos em tumores mamários de cadelas-Revisão de Literatura.** 2013. 36 f. Monografia (Graduação) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

KARAYANNOPOULOU, M. et al. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. **Journal of Comparative Pathology**, v. 133, p. 246-252, 2005.

LAVALLE, E.G. et al. Cox 2 Expression in Canine Mammary Carcinomas: Correlation with Angiogenesis and Overall Survival. **Veterinary Pathology**, Filadelfia, v. 46, n.6, p. 1275-1280, 2009.

LANA, S.E.; RUTTEMAN, G.R., WITHROW, S.J. Tumors of the mammary gland. In: Withrow SJ and Vail DM. Withrow & MacEwen's **Small Animal Clinical Oncology** 4.ed. St. Louis: Saunders Elsevier. 2007; 619-636.

LUIZ, C.R.; MIGLINA, M.A.; SANTOS, T.C. Segmentos anátomo-cirúrgicos arteriais da glândula mamária em cães (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758). **Archives of Veterinary Science**, Paraná, v.7, n.1, p.27-36, 2002.

MARTINS, L.R.; LOPES, M.D. Pseudociese canina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.29, n.3/4, p.137-141, 2005.

MARQUES, D.C.S. **Avaliação da expressão da Cox 2 em tumores mamários de cadelas**. 2013. 77f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina Veterinária Universidade de Lisboa, Lisboa, 2013.

MENDES, T.C., et al. Comparação entre os sistemas histomorfológico e de graduação histológica para classificação prognóstica de tumores mamários em cadelas. **Acta Scientiae Veterinariae**, Londrina, v.35, n.3, p.339-343, 2007.

MILLANTA, F. et al. COX 2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.98, p.115-120, 2006.

MISDORP, W. Tumour of mammary gland. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in domestic animals**. 4.ed. Iowa State: California, 2002, 788p.

MOL, J.A. et al. The role of progestins, insuline-like growth factor (IGF) and IGF-binding proteins in the normal and neoplastic mammary gland of the bitch: a review. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.51, p.339–344, 1997.

MORRISON, W.B. Cancers in dogs and cats. **Medical and surgical management**. Philadelphia : Willians & Wilkins, 1998. 785p.

NOWAK, M.; MADEJ, J.A.; DZIEGIEL, P. Immunohistochemical localization of Cox2 in cells of mammary adenocarcinomas in bitches as related to tumour malignancy grade. **The Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, Polônia, v. 49, p. 433-437, 2005.

OLIVEIRA-FILHO, J.C., et al. Estudo retrospectivo de 1647 tumores mamários em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v, 30, n.2, p.177-185, 2010.

OWEN, L. M. TNM Classification of tumors in domestic animals. **World Health Organization**, Geneva, p. 26-32, 1980.

PELETEIRO, M.C. Tumores mamários na cadela e na gata. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.89, n.509, p.10-29, 1994.

PEÑA, L. et al. Canine mammary tumors: a review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER-2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**, Philadelphia, v.20, n.10, nov. 2013.

PEREIRA, C.T. et al. Lymphatic drainage on healthy and neoplastic mammary glands in female dogs: can it really be altered? **Anatomia Histology Embryology**. v. 32, p.282–290, 2003.

PEREIRA, C.T. **Avaliação cintilográfica da vascularização e drenagem linfática das glândulas mamárias de cadelas.** 2005. 181f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

PEREIRA, C.T. 99mTc-labeled dextran for mammary lymphoscintigraphy in dogs. **Veterinary Radiology Ultrasound**. v. 49, p.487–491, 2008.

PEROU, C.M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v.406, p.747-752, 2000.

PHILIBERT, J.C. et al. Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.17, p.102-106, 2003.

QUEIROGA, F.L.; LOPES, C. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos fatores de prognóstico. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.97, n.543, p. 118-127, 2002.

QUEIROGA, F. L. *et al.* Cox 2 levels in canine mammary tumors, including inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological features and prognostic significance. **Anticancer Research**, v. 25, n. 6B, p. 4269-4275, 2005.

QUEIROGA, F.L. *et al.* The role of Cox 2 expression in the prognosis of dogs with malignant mammary tumours. **Research in Veterinary Science**, v. 88, p. 441-445, 2010.

QUEIROGA, F.L., *et al.* Canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: most recent findings. **In Vivo**. v. 25, n.3, p.455-65, 2011.

REIS, A.B.G. **Avaliação da lipemia, glicemia e leptinemia em cadelas obesas e com neoplasia mamária.** 2013. 103f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

RODRIGUES, M. M. P. **Imunomarcação de COX 2 e TGF-beta nas lesões proliferativas da próstata do cão.** 2007. 56f. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2007.

RUTTEMAN, G. R.; WITHROW, S. J.; MacEWEN, E. G. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S. J.; MacEWEN, E. G. **Small Animal Clinical Oncology.** 3. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2001. p. 455-477.

SAMUELSON, D.A. **Tratado de Histologia Veterinária.** 1.ed. São Paulo:Elsevier, 2007, p.544.

SIRIVAIKYAPONG, S. Dogs with mammary gland tumors and the feeding dietary types. In: **world small animal veterinary association world congress**, 2003, Proceedings..., Bangkok, Thailand.

SLATTER, D. et al. **Manual de cirurgia de pequenos animais.** 2. ed. São Paulo: Ed. Manole, 1998.

SLEECKX, N. et al. Canine Mammary Tumors, an Overview. **Reproduction Domestic Animal**, v.46, p.1112-1131, 2011.

SORENMO, K. U. Canine mammary gland tumors. Veterinary Clinics of North America: **Small Animal Practice**, v.33, p.573- 596, 2003.

SORENMO, K. U. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. **Veterinary Pathology**, Philadelphia, v.48, n.1, p. 85-97, 2011.

SORENMO, K. U., DEANNA, R. W., GOLDSMIDT, R. H. In: Tumors of the mammary gland. WITHROW SJ., VAIL DM. **Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology.** 5 ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company. 2013, 553-571.

SURH, Y. J. et al. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of antiinflammatory phytochemicals: down-regulation of Cox 2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. **Mutation Research**, v. 480-481, p. 243-268, 2001.

TAVARES, W.L.F. et al. Evaluation of adverse effects in tamoxifen exposed healthy female dogs. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.52, n.67, p.6, 2010.

TOLOSA, E. M. C., RODRIGUES, C. J., BEHMER, O. A., FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica.** 2 ed. Brueri: Manole, 2003, 331p.

TORÍBIO, J. M. M. L., et al. Caracterização clínica, diagnóstico histopatológico e distribuição geográfica das neoplasias mamárias em cadelas de Salvador, Bahia. **Revista Ceres**, Visçosa, v.59, n.4, p.427-433, 2012.

THRUSFIELD, M. **Epidemiologia Veterinária**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2004, 556p.

YOO, K. et al. Postmenopausal obesity as a breast cancer risk factor according to estrogen and progesterone receptor status. **Cancer Letters**, v.167, p.57-63, 2001.

WEIJER, K., et al. Feline malignant mammary tumors. II. Immunologic and electron microscopic investigations into a possible viral etiology. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 52, n.3, p.673-679, 1974.

ZATLOUKAL, J. et al. Breed and Age as Risk Factors for Canine Mammary Tumours. **Acta Veterinaria Brunensis**. v. 74, p.103-109, 2005.

ZUCCARI, D.A.P.C., SANTANA, A.E., ROCHA, N.S. Fisiopatologia da neoplasia mamária em cadelas – revisão. **Clínica Veterinária**, n. 32, p. 50-54, 2001.

ZUCCARI, D.A.P.C., SANTANA, A.E.; ROCHA, N.S. Expressão dos filamentos intermediários no diagnóstico dos tumores mamários de cadelas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, n.6, 2002.

ZUCCARI, D.A.P.C. Fatores prognósticos e preditivos nas neoplasias mamárias – importância dos marcadores imuno-histoquímicos nas espécies humana e canina – estudo comparativo. **Arquivo Ciência e Saúde**, v.15, n. 4, p. 189-198, 2008.