

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

LÍGIA FERNANDES GUNDIM

EXPRESSÃO DE HER-2 EM TUMORES MAMÁRIOS DE GATAS

UBERLÂNDIA

2017

LÍGIA FERNANDES GUNDIM

EXPRESSÃO DE HER-2 EM TUMORES MAMÁRIOS DE GATAS

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

Área de concentração: Saúde Animal

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi

UBERLÂNDIA
JANEIRO – 2017

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

G975e Gundim, Lígia Fernandes, 1987
2017 Expressão de Her-2 em tumores mamários de gatas / Lígia
Fernandes Gundim. - 2017.
43 f.

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

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

CDU: 619

Agradecimentos

A Deus por ter me dado a vida e condições para conseguir chegar até aqui.

Aos meu pais, Célia e Joaquim, pelo amor, exemplo, dedicação, por sonharem comigo e me mostrarem que o estudo é o melhor caminho. Nossos encontros aos fins de semana é o que me enche de energia para continuar seguindo.

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

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

À equipe do Laboratório de Patologia Animal, obrigada pelo apoio, em especial professores Márcio e Matias e aos amigos Mariana, Tais Meziara, William, Erica e Igor, sem vocês para me ajudar e me ouvir não teria a menor graça.

À minha família que sempre torceu por mim, em especial Izabel e Misael, pelo incentivo e pelo orgulho que têm ao falar do meu mestrado.

RESUMO

As neoplasias mamárias são o terceiro tipo mais frequente de neoplasias em felinos e a busca por fatores prognósticos para este tipo de tumor nas gatas tem se intensificado nos últimos anos, dada sua alta frequência e relevância na clínica de felinos. Dentre os marcadores imunohistoquímicos utilizados para prognóstico destaca-se o receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor type 2 – Her-2) que em mulheres está associado a um pior prognóstico. Objetivou-se avaliar a expressão de Her-2 em hiperplasias e neoplasias mamárias, benignas e malignas, de gatas e relacionar a expressão ao tipo e grau histológico dos carcinomas mamários. Foram selecionados 38 casos de neoplasias e hiperplasias mamárias de gatas, no período de 2006 a 2016. A partir dos protocolos selecionados obteve-se informações epidemiológicas e características macroscópicas das lesões nas mamas. Os tumores foram individualmente classificados e graduados histologicamente por dois patologistas. A expressão de Her-2 foi determinada por imunohistoquímica, por meio de análise semi quantitativa das lâminas conforme escore recomendado pelo Herceptest (Dako). Utilizou-se Teste Qui-quadrado (χ^2) para avaliação da relação entre expressão de Her-2 e tipo de lesão mamária, tipos histológicos de carcinoma e grau histológico ($P < 0,05$). A idade média dos animais foi de 8,5 anos e as gatas jovens foram acometidas somente por hiperplasias e neoplasias benignas. Gatas sem raça definida foram mais acometidas (84,37%), seguida por siamês (9,37%) e persa (6,25%). Quanto à classificação histológica, 18,42% das lesões mamárias foram classificadas como hiperplasia, 18,42% como adenoma e 63,16% foram classificadas como carcinoma. O tipo de carcinoma mais comum foi o carcinoma tubulopapilar (66,7%), seguido por carcinoma sólido (25%) e carcinoma cribriforme (8,33%). Observou-se superexpressão de Her-2 em 4 amostras (16,7%) de carcinoma do tipo tubulopapilar, sendo dois carcinomas grau I e dois graduação II, todavia não houve relação entre a expressão de Her-2 e o tipo de lesão mamária ($p = 0,3127$), tipo de carcinoma (0,3467) ou grau histológico (0,6485). Conclui-se que o percentual de carcinomas mamários de gatas que expressam Her-2 é menor que no câncer de mama da mulher e não houve relação entre grau e tipo histológico e expressão de Her-2.

PALAVRAS-CHAVE: c-erbB-2/neu, felino, neoplasia mamária.

ABSTRACT

Mammary neoplasms are the third most frequent type of neoplasm in felines and the search for prognostic factors for this type of tumor in cats has intensified in recent years, given its high frequency and relevance in feline clinics. Among the immunohistochemical markers used for prognosis, the Human Epidermal Growth Factor Receptor type 2 (Her-2) receptor, which in women is associated with a worse prognosis, stands out. The objective of this study was to evaluate the expression of Her-2 in hyperplasias and benign and malignant neoplasms of cats and to relate the expression to the type and histological grade of mammary carcinomas. Thirty-eight cases of neoplasia and mammary hyperplasia of cats were selected from 2006 to 2016. From the protocols selected, epidemiological information and macroscopic characteristics of mammary lesions were obtained. Tumors were individually classified and graded histologically by two pathologists. Her-2 expression was determined by immunohistochemistry, using a semi-quantitative analysis of the slides according to the Hercepest (Dako) recommended score. The Chi-square test (χ^2) was used to evaluate the relationship between Her-2 expression and type of mammary lesion, histological types of carcinoma and histological grade ($P < 0.05$). The mean age of the animals was 8.5 years and young cats were affected only by benign hyperplasias and neoplasms. Undefined cats were more affected (84.37%), followed by Siamese (9.37%) and Persian (6.25%). Regarding the histological classification, 18.42% of the mammary lesions were classified as hyperplasia, 18.42% as adenoma and 63.16% were classified as carcinoma. The most common type of carcinoma was tubulopapillary carcinoma (66.7%), followed by solid carcinoma (25%) and cribriform carcinoma (8.33%). Her-2 overexpression was observed in 4 samples (16.7%) of tubulopapillary carcinoma, two carcinomas grade I and two degrees II, but there was no relationship between Her-2 expression and type of mammary lesion ($P = 0.3127$), carcinoma type (0.3446) or histological grade (0.6485). It is concluded that the percentage of female mammary carcinomas expressing Her-2 is lower than in women's breast cancer and there was no relation between grade and histological type and Her-2 expression.

KEY WORDS: c-erbB-2 / neu, feline, mammary neoplasia.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO.....	8
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	9
2.1 Anatomia.....	9
2.2 Histologia.....	10
2.3 Lesões não neoplásicas.....	11
2.4 Neoplasias mamárias na gata.....	11
2.5 Classificação e graduação histológica	12
2.6 Fatores prognósticos.....	14
2.7 Her-2.....	16
2.8 Diagnóstico.....	21
2.9 Tratamento.....	21
REFERÊNCIAS.....	23

CAPÍTULO 2 – Expressão de HER-2 em lesões mamárias de gatas e relação com fatores de prognóstico.....	31
--	-----------

1. INTRODUÇÃO

A longevidade dos animais domésticos tem aumentado consideravelmente devido à melhor qualidade de vida, melhor nutrição e vacinas e tratamentos para doenças infecciosas que anteriormente eram letais. Com este aumento, nota-se também maior incidência de neoplasias (GIORGI, 2012).

Os tumores mamários são o terceiro tipo de neoplasia mais frequente em gatas (MACEWEN, 1990), correspondendo a 17% das neoplasias nesta espécie (SEIXAS et al., 2011). Dentre esses, o tipo mais frequente é o carcinoma tubulopapilar, seguido pelo carcinoma sólido e carcinoma cribriforme (MISDORP et al., 1999). Lesões proliferativas não-neoplásicas, como as hiperplasias, são alterações de mama comuns em gatas e que podem ser confundidas com tumores. Dentre estas destaca-se a hiperplasia fibroepitelial, cuja etiologia está relacionada ao uso de progestágenos (CARPENTER, 1987).

Muitos fatores prognósticos já estão estabelecidos para estes tumores como: estágio clínico, tamanho tumoral (ITO et al., 1996), grau histológico (HUGHES, DOBSON, 2012; DE CAMPOS et al., 2015), taxa de mitose (HUGHES, DOBSON, 2012; PREZIOSI et al., 2002) e invasão linfovascular (SEIXAS et al., 2011). Entretanto, Hughes e Dobson (2012) destacam a necessidade de investigação de marcadores imunohistoquímicos tanto para fornecer informações clínicas quanto para entender a patogênese molecular das neoplasias.

O proto-oncogene Her-2 (fator de crescimento epidérmico humano 2) é responsável pela codificação de uma glicoproteína transmembrana que atua como receptor de fator de crescimento e apresenta atividade de tirosina quinase específica. A ativação de Her-2 leva a diminuição de apoptose, proliferação celular, promoção da angiogênese e maior ocorrência de metástase (GLEICH e SALAMONE, 2002).

Em mulheres, a superexpressão de Her-2 em tumores mamários está relacionada à ocorrência de metástases (DHINGRA et al., 1996), maior taxa de recidiva e mortalidade (WOLFF et al., 2007). Apesar disso, pacientes cujos tumores superexpressam Her-2 respondem positivamente ao tratamento com trastuzumab, um anticorpo monoclonal humanizado (HONIG et al., 2011). Em cadelas, a positividade para Her-2 está associada a maior pleomorfismo nuclear, maior grau histológico e maior taxa de mitoses (DUTRA et al., 2004), todavia Hsu et al. (2009) observaram

associação da superexpressão com maior sobrevida e Ressel et al. (2013) questionam o valor prognóstico deste em cadelas, uma vez que lesões não neoplásicas também superexpressaram Her-2.

Em gatas, aproximadamente 10% dos tumores mamários superexpressam Her-2 e essa expressão está relacionada à maior tamanho do tumor, maior grau histológico (ORDÁS et al., 2007) e menor sobrevida (ORDÁS et al., 2007; DE CAMPOS et al., 2015, MILLANTA et al., 2005). Por outro lado, Rasotto et al. (2011) descrevem que tumores malignos e benignos não apresentam diferenças na expressão de Her-2, questionando o envolvimento deste na carcinogênese e seu valor como fator de prognóstico em gatas.

Os carcinomas mamários em gatas apresentam semelhanças ao câncer de mama na mulher, quanto à histopatologia (PÉREZ-ALENZA et al., 2004), padrão metastático (MACEWEN, 1990) e ausência de dependência hormonal (DE LAS MULAS et al., 2000), indicando que a gata pode ser um modelo animal adequado para o câncer de mama em mulheres (DE MARIA et al., 2005). Todavia, trabalhos abordando Her-2 em gatas ainda são escassos e mais estudos são necessários para esclarecer seu papel como fator prognóstico.

Objetivou-se avaliar a imunoexpressão de Her-2 em hiperplasias, neoplasias benignas e malignas em gatas e relacionar essa expressão ao tipo e grau histológico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Anatomia

As gatas possuem quatro pares de mamas dispostas desde a região axilar até a região inguinal, sendo denominadas torácica cranial, torácica caudal, abdominal cranial, abdominal caudal (RAHARISON e SAUET, 2006). A mama é composta por glândulas sudoríparas modificadas contendo ductos que ligam massas de epitélio secretor envolvido por tecido conjuntivo, gordura, vasos e nervos (DYCE, 2004).

Quanto à drenagem linfática, inicialmente foi descrito que as glândulas mamárias torácicas drenavam para o linfonodo axilar, enquanto as abdominais para o

linfonodo inguinal (SILVER, 1966). Entretanto, Raharison e Sauet (2006) demonstraram que a drenagem da glândula torácica caudal ocorre com maior frequência para o linfonodo axilar, podendo ainda drenar para o linfonodo inguinal, enquanto a glândula abdominal cranial usualmente drena para o linfonodo inguinal, todavia a drenagem pode ocorrer em ambas direções. Além disso, as glândulas torácicas podem ainda drenar para o linfonodo esternal.

2.2 Histologia

A glândula mamária é um sistema túbulo-alveolar composto, suportado por estroma de tecido conjuntivo e coberto por pele ligeiramente modificada. Na fêmea não lactante, a mama é ocupada predominantemente por estroma relativamente denso, gordura e tecido glandular (SILVER, 1966).

O parênquima da glândula mamária é composto por células epiteliais secretoras que formam os alvéolos mamários. Estes drenam para ductos pequenos que se unem a ductos maiores até desembocarem em uma cisterna ou diretamente no teto (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2000).

As células mioepiteliais, recobrem os alvéolos e ductos e são responsáveis pela ejeção de leite. Os alvéolos são agrupados em lóbulos, envolvidos por um septo de tecido conjuntivo, enquanto ao agrupamento de lóbulos dá-se o nome de lobos, estes também rodeados por tecido conjuntivo. Apesar de comumente o conjunto de lobos ser chamado de glândula mamária, cada lobo é de fato uma glândula (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2000).

Uma particularidade da gata é que o teto é constituído por três camadas: exterior, interior longitudinal e circular média, enquanto a cadela só possui 2 camadas (interna circular e externa longitudinal). Além disso, a gata possui 4 a 8 ductos, enquanto a cadela possui 8 a 20. Em ambas as espécies, o teto é composto por músculo liso, desprovido de glândulas sudoríparas e a extremidade é protegida pelo músculo esfíncter (SILVER, 1966).

2.3 Lesões não neoplásicas

As lesões não neoplásicas que ocorrem na glândula mamária de gatas são cistos, ectasia ductal, fibrose, hiperplasia ductal e lobular e alteração fibroadenomatosa, sendo esta última a mais frequente (MISDORP et al., 1999).

Enquanto os cistos são cavidades revestidas por células epiteliais sem conteúdo necrótico, a ectasia ductal é a dilatação cística de ductos com acúmulo de debris necróticos, variável número de macrófagos espumosos misturados com material lipídico e fendas de colesterol. Já as hiperplasias, são proliferações de células epiteliais, sendo que a hiperplasia ductal ocorre dentro do ducto, algumas vezes levando a oclusão do lúmen e a hiperplasia lobular ocorre nos lóbulos (MISDORP et al., 1999; GOLDSCHMIDT et al., 2011).

A alteração fibroadenomatosa, também chamada hiperplasia fibroepitelial (CARPENTER, 1987), hipertrofia mamária felina, alteração fibroadenomatosa total ou parcial, adenomatose mamária felina (HAYDEN et al., 1981) ou fibroadenoma juvenil (NIELSEN, 1993) tem etiologia associada à utilização de progestágenos naturais ou sintéticos. Macroscopicamente, uma ou mais mamas se apresentam aumentadas, macias ou flutuantes e a pele que recobre a mama pode estar avermelhada (LORETTI et al., 2004). Na histologia, nota-se proliferação de ductos mamários rodeados por estroma fino e abundante (MISDORP, 2002)

2.4 Neoplasias mamárias na gata

As neoplasias mamárias benignas em gatas são classificadas como papiloma ductal e adenoma simples, ambas com proliferação benigna da porção epitelial, adenoma complexo, quando ocorre proliferação das células mioepiteliais e fibroadenoma, que é a proliferação de células epiteliais lumbais e células do estroma (MISDORP et al., 1999).

As fêmeas felinas são mais acometidas por tumores mamários, no entanto 2% das neoplasias são diagnosticadas em gatos machos. A maioria dos tumores mamários são malignos, com proporção benigno:maligno variando de 1:9 (HAYES;

MILNE; MANDELL, 1981) até 1:14,27 (TOGNI et al., 2013) sendo o carcinoma o tipo histológico mais comum.

Gatas castradas antes dos 6 meses têm redução de 91% do risco de desenvolver carcinomas mamários em comparação à gatas não castradas e a esterilização após 1 ano têm redução de 86% do risco (OVERLEY et al., 2005). Ademais, a administração regular de progestágenos foi associada a um maior risco de ocorrência de tumores malignos e benignos (MISDORP, ROMIJN, HART, 1990).

Conforme Hayes, Milne e Mandell (1981) gatas da raça siamesa são mais acometidas com neoplasias mamárias, enquanto Costa (2010) descrevem a raça Europeu Comum como mais prevalente em Portugal. Togni et al. (2013) e Cunha et al. (2016) em estudos realizados no Brasil descrevem maior ocorrência em gatas sem raça definida.

2.5 Classificação e graduação

A classificação mais utilizada para neoplasias mamárias em gatas é a do Instituto de Patologia das Forças Armadas - Organização Mundial da Saúde (OMS) (MISDORP et al., 1999). Nela, os tumores são classificados como: carcinoma tubulopapilar, quando as células neoplásicas se dispõem em túbulos e papilas; carcinoma sólido, quando as células formam uma massa compacta, dispostas em manto e carcinoma cribriforme, no qual as células epiteliais apresentam espaços entre elas, com aspecto de peneira. Quando a neoplasia está circunscrita pela membrana basal, atribui-se a classificação de carcinoma *in situ*. Outras classificações menos frequentes são carcinoma de células escamosas, carcinoma mucinoso, carcinossarcoma e carcinoma adenoescamoso.

Alguns autores como De Campos et al. (2015) e Seixas et al. (2011) utilizam uma adaptação da classificação da OMS, incluindo o tipo histológico carcinoma em tumor misto, quando o carcinoma tubulopapilar, sólido ou cribriforme era acompanhado de proliferação mioepitelial com formação de matriz mixoide, condroide ou cartilaginosa. Já Manesh et al. (2014) utilizou a classificação proposta por Rosen e Oberman (1993) para tumores de glândula mamária de mulheres.

Com relação à agressividade dos tipos histológicos de carcinomas mamários, Mills et al., (2015) descrevem o carcinoma cribriforme como o mais agressivo (média de sobrevida 10 meses), seguido pelo carcinoma sólido (média 36 meses) e carcinoma tubulopapilar (média de 61 meses).

Goldschmidt et al. (2016) relataram que o carcinoma inflamatório mamário felino e o carcinoma micropapilar invasivo felino, recentemente descritos, estão associados a menor sobrevida (4 a 5 meses), enquanto que os carcinomas ductais e carcinomas papilares intraductais têm um comportamento menos agressivo (média de 35 meses de sobrevida).

Para graduação histológica destes tumores, o método mais amplamente utilizado é o proposto por Elston e Ellis (1993), onde o grau histológico é obtido a partir de formação tubular, pleomorfismo e número de mitoses (Tabela 1).

Tabela 1. Graduação histológica de tumores mamários segundo Elston e Ellis (1993).

Característica	Escore
Formação tubular	
Maioria do tumor (>75%)	1
Moderada (10-75%)	2
Pequena ou nenhuma (<10%)	3
Pleomorfismo nuclear	
Discreto	1
Moderado	2
Marcado	3
Mitoses	
0 a 8	1
9 a 16	2
>17	3

3-5: Grau I; 6-7: Grau II; 8-9: Grau III.

2.6 Fatores de prognóstico

Muitos estudos têm sido realizados no sentido de estabelecer fatores prognósticos para neoplasias mamárias felinas. Sabe-se que animais que apresentam tumores maiores que 3 cm possuem menor sobrevida (ITO et al., 1996). Mills et al. (2015) também descrevem maior sobrevida associada a tumores menores que dois centímetros (média de 51 meses), enquanto animais com tumores maiores que 2 cm apresentaram média de 19 meses de sobrevida. Por outro lado, Viste et al. (2002) não encontraram relação entre tamanho tumoral e sobrevida e ressaltam a necessidade de associação do tamanho a outros fatores de prognóstico.

A graduação histológica é um dos preditores prognósticos mais significativos nos tumores mamários felinos (GOLDSCHMIDT et al., 2016). Seixas et al. (2011) descrevem que animais com tumores grau I viveram em média 36 meses, enquanto aqueles com tumores grau III tiveram sobrevida média de 6 meses. Da mesma forma, De Campos et al. (2015) também descrevem menor sobrevida associada a tumores grau III, com média de sobrevida de 54 meses em gatas com tumores grau I e apenas 2,6 meses associada a tumores grau III. As neoplasias classificadas como grau II não possuem prognóstico bem estabelecido (CASTAGNARO et al., 1998a)

Com respeito à idade, a incidência de tumores mamários em gatas aumenta após os 6 anos e o pico de ocorrência é entre 10 a 11 anos (GIMÉNEZ et al., 2010). Hayes, Milne e Mandell (1981) relatam que em gatas mais velhas é mais frequente a ocorrência de tumores malignos que benignos. Por outro lado, Mills et al. (2015) não observaram associação entre a idade do diagnóstico e a sobrevida, sendo que animais com idade ≤ 11 anos viveram em média 15 meses após a cirurgia e os >11 anos mostraram média de 14 meses de sobrevida.

Quanto ao estadiamento clínico, gatas com estágio clínico 4 possuem pior prognóstico, com sobrevida em média de 1 mês. Animais com estágio clínico 1 sobrevivem em média 29 meses, estágio 2, 12,5 meses e estágio 3 possuem média de 9 meses (Ito et al., 1996). Seixas et al. (2011) associando o estadiamento à graduação histológica, relatam ainda que animais com estágio 3 possuem também graduação histológica maior (grau III).

O índice mitótico é considerado um indicador prognóstico independente para neoplasias mamárias (HUGHES E DOBSON, 2012). Preziosi et al. (2002) relataram que 70% dos animais com baixo grau de proliferação (índice mitótico ≤ 0.72) estavam

vivos até 24 meses após a cirurgia e dentre os animais com alto grau de proliferação (índice mitótico >0.72), apenas 10% sobreviveram nesse período. Do mesmo modo, Seixas et al. (2011) descreveram que gatas com índice mitótico ≤ 1.1 viveram em média 13 meses e animais com índice mitótico ≥ 1.1 possuíam sobrevida média 7 meses.

Os Agnors (regiões organizadoras nucleares marcadas por nitrato de prata) são utilizados para marcação de proliferação celular. De Vico et al. (1995) não encontraram associação entre marcação de Agnor e outros fatores prognósticos para tumores de mama em gatas como tipo histológico, estágio tumoral, grau de atipia nuclear e taxa de mitose. Já Castagnaro et al. (1998b) estudando apenas carcinomas, analisou 100 células no aumento de 100x e descreveram que 78% das gatas que apresentaram contagem de Agnor até 5.9/campo tumoral permaneceram vivas após um ano da cirurgia e dentre as que apresentaram contagem maior que 5.9 apenas 22%. Preziosi et al. (2002) afirmam ainda que dentre os animais com contagem de Agnor ≤ 3.19 /campo, 65% estavam vivos dois anos após a cirurgia, enquanto aqueles com contagem < 3.19 , apenas 25% não haviam morrido.

O Ki-67 também é um marcador de proliferação celular, cuja expressão é mais intensa em carcinomas do que em tumores benignos e maior também em mamas hiperplásicas que em mamas normais (PEREIRA et al., 2004). Silva et al. (2016) descreveram índice Ki-67 médio de 27,5%, não encontraram relação entre contagem Ki67 e tipo e grau histológico, todavia a contagem de Ki67 estava aumentada em tumores com sinais de necrose.

Já Castagnaro et al. (1998b) verificaram que animais com tumores que expressam mais ki67, têm pior prognóstico, sendo que dentre os que tinham neoplasias com índice Ki67 $\leq 25,2$, 87,5% permaneceram vivos um ano após a cirurgia, percentual que diminuiu para 12,5% naqueles que apresentaram índice $\geq 25,2$.

Quanto aos marcadores hormonais, De Las Mulas et al. (2000) descreveram que 33% das hiperplasias mamárias eram positivas para receptor de estrógeno e progesterona, enquanto nas neoplasias malignas, 16,67% foram positivas. A menor expressão de receptores de estrógeno por carcinomas mamários também foi relatada por Brunetti et al. (2013), que observaram que 9,52% dos carcinomas (tipos sólido e tubulopapilar) em gatas expressaram receptor de estrógeno e 42,86% expressaram

receptor de progesterona. Do mesmo modo, Millanta et al. (2005) relataram que mamas sem alterações, hiperplásicas e com neoplasias benignas apresentam maior expressão de receptor de estrógeno e que lesões displásicas e *in situ* apresentam maior expressão do receptor de progesterona. Entretanto, ao contrário do que ocorre em humanos, não houve relação entre ausência de expressão e menor sobrevida.

2.7 Her-2

O Her-2 pertence à família dos receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFR). Esta família é composta por quatro proteínas (HER1, HER-2, HER3 e HER4), que funcionam como receptores, apresentando atividade tirosina quinase (AKIYAMA et al., 1986). Em humanos, o gene responsável pela expressão do Her-2 se encontra na banda q21 do cromossomo 17 e codifica uma proteína transmembrana de 185 kDa que atua como receptor de fator de crescimento (SLAMON, 1989) e apresenta três domínios: o extracelular, o transmembranar e o intracelular. O domínio extracelular é composto, por sua vez, por quatro subdomínios: L1, CR1, L2 e CR2 (I, II, III, IV), que se dispõem numa repetição em tandem de 2 unidades, separadas por resíduos ricos em cisteína. Este domínio extracelular contém um local de ligação para o ligando e regula a dimerização induzida por este. O domínio transmembrana é composto por uma hélice α de natureza hidrofóbica. O domínio intracelular é formado por uma região citoplasmática com um domínio altamente conservado e uma cauda C-terminal regulatória (KRAUS et al., 1989). Este domínio apresenta atividade tirosina quinase e os locais para autofosforilação que a regulam.

Em gatas, o gene Her-2 correspondente possui 92% de similaridade ao humano (DE MARIA et al., 2005) e está localizado no cromossomo E-1 (GenBank, 2013).

A ativação de Her-2 não depende de um ligante extracelular, mas sim da formação de dímeros (Her-2:2) ou heterodímeros (Her-2:Her-3) (EARP et al., 1995). Esta ativação resulta em diminuição de apoptose, proliferação celular, promoção da angiogênese (GLEICH; SALAMONE, 2002), diferenciação, adesão e motilidade celular (SCHNITT, 2001).

Os métodos de diagnóstico recomendados pela FDA (Food and Drug Administration - USA) são imunohistoquímica, FISH (hibridização fluorescente *in situ*) e CISH (hibridização *in situ* cromogênica) (MENG et al., 2004). A técnica imunohistoquímica consiste na detecção de antígenos através da ligação específica a anticorpos e duas formas de avaliação de imunomarcagem para Her2 foram propostas, ambas considerando positivas apenas marcação na membrana. Conforme o manual Herceptest®, são considerados positivos os tumores com escore 2+ (coloração fraca a moderada em toda a circunferência da membrana, observada em mais de 10% das células tumorais) e 3+ (coloração intensa em toda a membrana, observada em mais de 10% de todas as células tumorais), enquanto no método proposto pela American Society of Clinical Oncology, apenas tumores escore 3+ são considerados positivos e as neoplasias classificadas como 2+ são consideradas suspeitas (WOLFF et al., 2013).

Cuello-Carrion et al. (2015) observaram que em condições estressantes, como a administração de cádmio e H₂O₂, a imunomarcagem para Her-2 pode migrar para o citoplasma e áreas perinucleares e Korlinova et al. (1992) relataram que a marcação citoplasmática pode ocorrer devido à internalização e degradação do c-erbB-2 nos compartimentos lisossômicos.

Aproximadamente 20% dos tumores mamários em mulheres superexpressam Her-2 na membrana celular (DE POTTER, 1994; MOLINA et al., 1991). A superexpressão de Her-2 está associada à amplificação gênica em 90% dos casos (BÁNKFALVI et al., 2000; DOWSETT et al., 2003). A amplificação gênica é analisada através das técnicas de FISH e CISH no cromossomo 17, local onde que está localizado o gene Her-2 (HANNA et al., 2014). A FISH é considerada padrão-ouro para determinação de status Her-2 e é recomendada pela FDA quando o tumor apresenta escore 2+ ou 3+ na imunohistoquímica (NUNES, 2013).

A técnica tradicional de FISH consiste em utilização de uma única sonda, no entanto Luoh et al. (2013) consideram que 5 a 10% dos cânceres primários com amplificação de Her-2 e sem superexpressão são falso-positivos, devido à incompleta amplificação da região menor de Her-2 e recomendam a utilização de várias sondas para aumentar a acurácia. Iorfida et al. (2012) relataram ainda que 13% das pacientes com status Her-2 1+ mostraram amplificação gênica e recomendam a utilização de

FISH em tumores que apresentem alto grau histológico, alto índice proliferativo, ausência de expressão de receptores hormonais e presença de invasão vascular.

Um outro método de diagnóstico de Her-2 foi proposto por Meng et al. (2004), no qual células cancerígenas circulantes são detectadas no sangue e o status Her-2 destas células avaliado por FISH, sendo que houve concordância de 97% entre o status Her-2 do tumor primário e das células circulantes.

Mulheres com tumores que superexpressam Her-2 estão mais propensas a desenvolver metástases (DHINGRA et al., 1996), além de apresentarem maior taxa de recidiva local (NGUYEN et al., 2008), menor tempo livre da doença (MONTAGNA et al., 2013), maior mortalidade (WOLFF et al., 2007) e maior resistência ao tratamento com quimioterapia e radioterapia (ROSS e GRAY, 2002).

Apesar de estar associada a maior agressividade e pior prognóstico, a superexpressão de Her-2 é fator preditivo em câncer de mama em mulheres. Da mesma forma que tumores positivos para imunomarcção de estrógeno e receptor de progesterona são susceptíveis à tratamento hormonal, tumores com superexpressão deste marcador possuem resposta positiva ao tratamento com trastuzumab (HONIG et al., 2011). O trastuzumab é um anticorpo monoclonal dirigido ao domínio extracelular da proteína Her-2 aprovado pela FDA em 1998 como tratamento para cânceres Her-2 positivo (ROMOND et al., 2005).

Korkaya et al. (2008) sugerem que os efeitos da amplificação de Her-2 na carcinogênese, tumorigênese e invasão podem ser devido aos seus efeitos em células tronco mamárias normais e malignas. Estes autores demonstraram que em ratos, a superexpressão de Her-2 em linhagens celulares de carcinoma mamário estava associada ao aumento da expressão de ALDH (aldeído desidrogenase humana), uma proteína responsável pela oxidação de aldeídos intracelulares e utilizada para o isolamento das células-tronco tumorais. A superexpressão de Her-2 mostrou ainda associação com aumento da invasão e da tumorigênese *in vitro*.

Além dos carcinomas mamários, a superexpressão de Her-2 também é fator prognóstico em outros tumores, tais como tumores de origem epitelial em ovário, nos quais é associada a um menor tempo de sobrevida (BERCHUCK et al., 1990), e câncer de endométrio, em que está associado ao aumento da mortalidade devido à neoplasia (BERCHUCK et al., 1991). Já em carcinomas hepatocelulares, a expressão

de Her-2 foi insignificante e o tratamento com trastuzumab não mostrou resultado satisfatório (HSU C. et al., 2002).

Em cadelas, vários estudos foram feitos no sentido de elucidar o papel do Her-2 nas neoplasias mamárias. Cerca de 17% a 35% das neoplasias mamárias são positivas para Her-2, no entanto, a importância deste imunomarcador como fator prognóstico permanece incerta nesta espécie (DE LAS MULAS et al., 2003; HSU W. et al., 2009; BURRAI et al., 2015).

Dutra et al. (2014) descreveram associação de superexpressão de Her-2 e maior pleomorfismo nuclear, maior grau histológico e maior taxa de mitoses. Ao contrário do que é observado em mulheres, nas quais a superexpressão está associada à menor taxa de sobrevida, Hsu W. et al. (2009) descreveram que em cadelas esta está associada ao aumento da sobrevida e Ressel et al. (2013) observaram superexpressão tanto em tumores malignos quanto em lesões não neoplásicas.

Quanto à expressão gênica de Her-2 em cadelas, Burrai et al. (2015), através de PCR em tempo real, observaram que a glândula mamária normal apresentou menor expressão quando comparada a adenoma simples e carcinoma simples, no entanto não houve diferença entre a expressão em tumores benignos e malignos. Já De Las Mulas et al. (2003) observaram que 17,6% dos carcinomas mamários em cadelas superexpressaram Her-2, no entanto não houve amplificação genética por hibridação *in situ* cromogênica (CISH) como ocorre em mulheres.

A positividade para Her-2 em neoplasias mamárias felinas está associada ao maior tamanho tumoral, maior grau histológico e ausência de expressão para receptores hormonais (ORDÁS et al., 2007), menor tempo de sobrevida (DE CAMPOS et al., 2015) e devido às semelhanças histopatológicas, ausência de dependência hormonal na maioria dos tumores e expressão de Her-2 pode ser usada como modelo animal para câncer de mama em mulheres (DE MARIA et al., 2005). Por outro lado, a expressão de Her-2 não apresenta relação com marcação para ki67 e p53 e nem diferença entre a imunoexpressão em tumores benignos e malignos (Rasotto et al., 2011), questionando o papel do Her-2 na carcinogênese e prognóstico em gatas.

A amplificação gênica em carcinomas mamários felinos é baixa. Ordás et al. (2007) descreveram que apenas 16% dos tumores Her-2 positivos possuíam

amplificação gênica, número muito inferior ao observado em mulheres, mas sugerem que a gata pode ser usada como modelo para câncer de mama que não apresenta amplificação gênica. Da mesma forma, Soares et al. (2013) observaram que 33% dos carcinomas mamários superexpressaram Her-2, no entanto a amplificação gênica não foi observada, pois apenas um ou dois sinais do gene foram detectados por núcleo.

Com respeito à transição epitélio-mesênquima em felinos, Karabolovski et al. (2015) observaram que a diminuição de expressão de marcadores epiteliais (citoqueratina) e de adesão (E-caderina) e aumento da expressão de vimentina (marcador de células mesenquimais) foi mais frequentemente observado em carcinomas de maior malignidade, o que indica a ocorrência de alterações sugestivas de transição epitélio-mesênquima em carcinomas mamários de gatas. Todavia, não há estudos que abordem a associação de transição epitélio-mesênquima e superexpressão de Her-2 como em mulheres.

A transição epitélio-mesenquimal ocorre em carcinomas mamários em mulheres e é caracterizada por transformação de características epiteliais para fenótipo mesenquimal, que facilita a ocorrência de metástases. Células tumorais circulantes com aumento de EMT-TFs (fatores de indução de transição epitélio mesenquima) foram isoladas a partir de sangue periférico de pacientes Her-2 positivas e pacientes com EMT-TFs em células tumorais circulantes tinham mais células ALDH + e CD133 + (GIORDANO et al., 2012).

2.8 Diagnóstico

O diagnóstico clínico de neoplasias mamárias é feito pela palpação das glândulas mamárias e a citologia por agulha fina pode ser utilizada como teste de triagem, tanto para avaliação das mamas afetadas, quanto dos linfonodos regionais. As vantagens deste exame são o baixo custo, agilidade nos resultados, eliminação de diagnósticos diferenciais, como mastites e hiperplasias, além de mostrar forte correlação com a histopatologia (SHAFIEE et al., 2013; MANESH et al., 2014).

Já o exame histopatológico, possibilita a avaliação da arquitetura do tecido, permitindo a graduação e classificação histológica destes tumores, o que contribui para uma melhor avaliação prognóstica. Na histopatologia, pode-se ainda avaliar a presença de embolos neoplásicos em vasos ou metástase em linfonodos, caso estes forem coletados (SHAFIEE et al., 2013). Exames radiológicos de tórax nas projeções látero-lateral direita e esquerda e ventro-dorsal, podem ser utilizados para avaliar a presença de metástases à distância (GIMÉNEZ et al., 2010).

2.9 Tratamento

Ao contrário do cão, em que ressecções mais conservadoras podem ser apropriadas em alguns casos, a maioria das gatas com neoplasia mamária maligna necessita de mastectomia unilateral ou bilateral (GIMÉNEZ et al., 2010). Macewen et al. (1984) afirmam ainda que animais submetidos a cirurgia radical tem maior tempo livre da doença se comparados aos que fizeram cirurgia conservativa ao contrário de Ito et al. (1996) não encontraram diferença estatística na sobrevida de gatas submetidas a mastectomia parcial ou total.

Usualmente, o linfonodo inguinal é removido juntamente à cadeia mamária e a exérese do linfonodo axilar só é recomendada caso este se apresentar aumentado ou com metástase comprovada por citologia (LANA et al., 2007), todavia, Morris (2013) descreve não haver evidências que a exérese nodal intervenha na sobrevida.

Os benefícios do uso da quimioterapia como adjuvante à excisão cirúrgica de tumores mamários em gatas ainda não estão claros (MORRIS, 2013). Mauldin et al. (1988) relatam citorredução com utilização de doxorubicina e ciclofosfamida e McNeill et al. (2009) descrevem que os animais tratados com doxorubicina apresentaram maior tempo de sobrevida e maior tempo livre da doença, assim como Novosad et al. (2006) que relatam maior média de sobrevida em gatas que foram tratadas cirurgicamente e utilizaram doxorubicina.

Por outro lado, Ito et al. (1996) observaram prognóstico pior nas gatas tratadas com ciclosporina e/ou vincristina. Não há relatos de uso de quimioterápicos anti-

estrogênio, como o tamoxifeno, visto que a maior parte dos tumores felinos não possuem receptores de estrógeno (MORRIS, 2013).

REFERÊNCIAS

AKIYAMA, T.; SUDO, C.; OGAWARA, H.; TOYOSHIMA, K.; YAMAMOTO, T. The product of the human c-erbB-2 gene; a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. **Science**, v. 232, p. 1644-1647, 1986.

BANKFALVI, A.; SIMON, R.; BRANDT, B.; BÜRGER, H.; VOLLMER, I.; DOCKHORN-DWORNICZAK, B.; LELLÉ, R.J.; BOECKER, W. Comparative methodological analysis of erbB-2/HER-2 gene dosage, chromosomal copy number

and protein overexpression in breast carcinoma tissues for diagnostic use. **Histopathology**, v. 37, n. 5, p. 411-419, 2000

BERCHUCK, A.; KAMEL, A.; WHITAKER, R.; KERNS, B.; OLT, G.; KINNEY, R.; SOPER, J. T.; DODGE, R.; CLARKE-PEARSON, D. L.; MARKS, P.; MCKENZIE, S.; YIN S.; BAST JR, R. C. Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. **Cancer Research**, v. 50, n. 13, p. 4087-4091, 1990.

BERCHUCK, A.; RODRIGUEZ, G.; KINNEY, R. B.; SOPER, J. T.; DODGE, R. K.; CLARKE-PEARSON, D. L.; BAST, R. C. Overexpression of HER-2/neu in endometrial cancer is associated with advanced stage disease. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 164, n. 1, p. 15-21, 1991.

BURRAI, G. P.; TANCA, A.; DE MIGLIO, M. R.; ABBONDIO, M.; PISANU, S.; POLINAS, M.; PIRINO, S.; MOHAMMED, S.I.; UZZAU, S.; ANTUOFERMO, E. Investigation of HER2 expression in canine mammary tumors by antibody-based, transcriptomic and mass spectrometry analysis: is the dog a suitable animal model for human breast cancer?. **Tumor Biology**, v. 36, n. 11, p. 9083-9091, 2015.

CASTAGNARO, M.; CASALONE, C.; RU, G.; NERVI, G. C.; BOZZETTA, E.; & CARAMELLI, M. Argyrophilic nucleolar organiser regions (AgNORs) count as indicator of post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. **Research in Veterinary Science**, v. 64, n. 2, p. 97-100, 1998.

CASTAGNARO, M.; CASALONE, C.; BOZZETTA, E.; DE MARIA, R.; BIOLATTI, B.; CARAMELLI, M. Tumour grading and the one-year post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. **Journal of Comparative Pathology**, v. 119, n. 3, p. 263-275, 1998.

CARPENTER, J. L.; ANDREWS, L. K.; HOLZWORTH, J. E. A. N. Tumors and tumor-like lesions. In: HOLZWORTH, J. **Diseases of the cat: Medicine and surgery**. 1987. Saunders, Philadelphia, p. 483-486.

COSTA, Monica Mendes. **Estudo epidemiológico e anatomo-patológico de tumores mamários na cadela e na gata**. 2010. 135 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária)- Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2010.

CUELLO-CARRIÓN, F. D.; SHORTREDE, J. E.; ALVAREZ-OLMEDO, D.; CAYADO-GUTIÉRREZ, N.; CASTRO, G. N.; ZOPPINI, F. C.; GUERRERO, M.; MARTINIS, E.; WUILLOUD, R.; GÓMEZ, N. N.; BIAGGIO, V.; OROZCO, J. GAGO, F. E.; CIOCCA, L. A.; FANELLI, M. A.; CIOCCA, D. R. HER2 and β -catenin protein location: importance in the prognosis of breast cancer patients and their correlation when breast cancer cells suffer stressful situations. **Clinical e Experimental Metastasis**, v. 32, n. 2, p. 151-168, 2015

DE LAS MULAS, J. M.; VAN NIEL, M.; MILLAN, Y.; BLANKENSTEIN, M. A.; VAN MIL, F.; MISDORP, W. Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in feline mammary gland benign and malignant lesions: comparison with biochemical assay. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 18, n. 1, p. 111-125, 2000.

DE LAS MULAS, J. M.; ORDÁS, J.; MILLÁN, Y.; FERNÁNDEZ-SORIA, V.; CAJAL, S. R. Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 80, n. 3, p. 363-367, 2003.

DE CAMPOS, C. B.; DAMASCENO, K. A.; GAMBA, C. O.; RIBEIRO, A. M.; MACHADO, C. J.; LAVALLE, G. E.; CASSALI, G. D. Evaluation of prognostic factors and survival rates in malignant feline mammary gland neoplasms. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 18, n. 12, p. 1003-1012, 2016.

DE MARIA, R.; OLIVERO, M.; IUSSICH, S.; NAKAICHI, M.; MURATA, T.; BIOLATTI, B.; DI RENZO, M. F. Spontaneous feline mammary carcinoma is a model of HER2 overexpressing poor prognosis human breast cancer. **Cancer Research**, v. 65, n. 3, p. 907-912, 2005.

DE POTTER, C. R. The neu-oncogene: more than a prognostic indicator?. **Human Pathology**, v. 25, n. 12, p. 1264-1268, 1994.

DE VICO, G.; MAIOLINO, P.; RESTUCCI, B. Silver-stained nucleolar (Ag-NOR) cluster size in feline mammary carcinomas: lack of correlation with histological appearance, mitotic activity, tumour stage, and degree of nuclear atypia. **Journal of Comparative Pathology**, v. 113, n. 1, p. 69-73, 1995.

DHINGRA, K.; HORTOBAGUI, G.; Critical evaluation of prognostic factors. **Seminars in Oncology**, v.23, n.4, p. 434-445. 1996.

DOWSETT, M.; BARTLETT, J.; ELLIS, I. O.; SALTER, J.; HILLS, M.; MALLON, E.; WATTERS, A. D.; COOKE, T.; PAISH, C.; WENCYK, P.M.; PINDER, S. E. Correlation between immunohistochemistry (HercepTest) and fluorescence in situ hybridization (FISH) for HER-2 in 426 breast carcinomas from 37 centres. **The Journal of Pathology**, v. 199, n. 4, p. 418-423, 2003.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C.J.G. Glândula mamária. In: DYCE, K. M.; WENSING, C. J. G.; SACK, W. O. **Tratado de Anatomia Veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. Cap. 10, p. 357-358

DUTRA, A. P.; GRANJA, N. V. M.; SCHMITT, F. C.; CASSALI, G. D. c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 11, p. 1673-1681, 2004.

EARP, H. S.; DAWSON, T. L.; LI, X.; YU, H. Heterodimerization and functional interaction between EGF receptor family members: a new signaling paradigm with implications for breast cancer research. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 35, n. 1, p. 115-132, 1995.

ELSTON, E. W.; ELLIS, I. O. Method for grading breast cancer. **Journal of Clinical Pathology**, v. 46, n. 2, p. 189, 1993.

GENBANK. **ERBB2 erb-b2 receptor tyrosine kinase 2 [Felis catus (domestic cat)]**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=her-2 felis catus>>. Acesso em: 30 jan. 2017.

GIMÉNEZ, F.; HECHT, S.; CRAIG, L. E.; LEGENDRE, A. M. Early detection, aggressive therapy optimizing the management of feline mammary masses. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, n. 3, p. 214-224, 2010.

GIORDANO, A.; GAO, H.; ANFOSSI, S.; COHEN, E.; MEGO, M.; LEE, B. N.; TIN, S.; LAURENTIIS, M.; PARKER A. C.; ALVAREZ. R. H.; VALERO, V.; UENO, N.T.; PLACIDO, S.; MANI, S.A; ESTEVA, F. J.; CRISTOFANILI, M.; REUBEN, J.M. Epithelial–mesenchymal transition and stem cell markers in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 11, n. 11, p. 2526-2534, 2012.

GIORGI, M. Veterinary pharmacology: is it still pharmacology's cinderella. **Clinical & Experimental Pharmacology**, v. 2, p. 103, 2012.

GLEICH, L.; SALAMONE, F; N. Molecular genetics of head and neck cancer. **Cancer Control**, v. 9, n. 5, p. 369-378, 2002.

GOLDSCHMIDT, M.; PENA, L.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V. Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary Pathology Online**, v. 48, n. 1, p. 117-131, 2011.

GOLDSCHMIDT ,M. H., PEÑA, L. ZAPPULI, V. Tumors of the mammary gland.In: MEUTEN, D.J. **Tumors in Domestic Animals**. 5 ed. Ames : John Wiley & Sons, 2016, cap. 17, p. 723- 765.

HANNA, W. M.; RÜSCHOFF, J.; BILOUS, M.; COUDRY, R. A.; DOWSETT, M.; OSAMURA, R. Y.; PENAULT-LLORCA, F.; VIJVER, M.V.; VIALE, G. HER2 in situ hybridization in breast cancer: clinical implications of polysomy 17 and genetic heterogeneity. **Modern Pathology**, v. 27, n. 1, p. 4-18, 2014.

HAYES J.R.; MILNE, K. L.; MANDELL, C. P. Epidemiological features of feline mammary carcinoma. **The Veterinary Record**, v. 108, n. 22, p. 476-479, 1981.

HAYDEN, D. W.; JOHNSTON, S. D.; KIANG, D. T.; JOHNSON, K. H.; BARNES, D. M. Feline mammary hypertrophy/fibroadenoma complex: clinical and hormonal aspects. **American Journal of Veterinary Research**, v. 42, n. 10, p. 1699-1703, 1981.

HONIG, A.; DIESSNER, J.; DIETL, J.; WISCHHUSEN, J. P1-04-05: T-DM1 and Pertuzumab as New Tools for HER2 Specific Antibody-Therapy Against Breast Cancer Stem Cells in HER2–Positive Mammary Carcinoma. **Cancer Research**, v.71, p. 71, 2011.

HSU, C.; HUANG, C. L.; HSU, H. C.; LEE, P. H.; WANG, S. J.; CHENG, A. L. HER-2/neu overexpression is rare in hepatocellular carcinoma and not predictive of anti-HER-2/neu regulation of cell growth and chemosensitivity. **Cancer**, v. 94, n. 2, p. 415-420, 2002.

HSU, W. L.; HUANG, H. M.; LIAO, J. W.; WONG, M. L.; CHANG, S. C. Increased survival in dogs with malignant mammary tumours overexpressing HER-2 protein and detection of a silent single nucleotide polymorphism in the canine HER-2 gene. **The Veterinary Journal**, v. 180, n. 1, p. 116-123, 2009.

HUGHES, K.; DOBSON, J. M. Prognostic histopathological and molecular markers in feline mammary neoplasia. **The Veterinary Journal**, v. 194, n. 1, p. 19-26, 2012.

IORFIDA, M.; DELLAPASQUA, S.; BAGNARDI, V.; CARDILLO, A.; ROTMENSZ, N. MASTROPASQUA, M.G.; BOTTIGLIERI, L.; GOLDBIRSCH, A.; VIALE, G.; COLLEONI, M.HER2-negative (1+) breast cancer with unfavorable prognostic

features: to FISH or not to FISH?. **Annals of Oncology**, v. 23, n. 5, p. 1371-1372, 2012

ITO, T.; KADOSAWA, T.; MOCHIZUKI, M.; MATSUNAGA, S.; NISHIMURA, R.; SASAKI, N. Prognosis of malignant mammary tumor in 53 cats. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 58, n. 8, p. 723-726, 1996.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Pele e anexos. In: **Histologia básica**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.4. p. 575-606. 2000.

KARABOLOVSKI, N.; KURILJ, A. G.; SEVERIN, K.; HOHŠTETER, M.; ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN, I. C.; MEDVEN, L.; ARTUKOVIC, B.; GRABAREVIC, Z. An Immunohistochemical Study of Epithelial-mesenchymal Transition in Feline Mammary Tumors. In: **ESVP-ECVP ANNUAL MEETING 2015**, 2015, Helsinki. Disponível em: < <http://bib.irb.hr/prikazi-rad?rad=774977> > Acesso em: 31 jan 2017.

KORKAYA, H.; PAULSON, A.; IOVINO, F.; WICHA, M. HER2 regulates the normal and malignant mammary stem/progenitor cell population that drives tumorigenesis and invasion. **Cancer Research**, v. 68, p. 12-16, 2008.

KORNILOVA, E.S.; TAVERNA, D.; HOECK, W.; HYNES, N.E. Surface expression of erbB-2 protein is post-transcriptionally regulated in mammary epithelial cells by epidermal growth factor and by the culture density. **Oncogene**, v. 7, n. 3, p. 511-519, 1992.

KRAUS, M. H.; ISSING, W.; MIKI, T.; POPESCU, N. C.; AARONSON, S. A. Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 23, p. 9193-9197, 1989.

LANA, S. E.; RUTTEMAN, G. R.; WITHROW, S. J. Tumors of the mammary gland. In: Withrow S.J.; Vail D.M. **Small Animal Clinical Oncology**, 4.ed. Canada: Saunders Elsevier, 2001, cap. 17 p. 619-636, 2007.

LORETTI, A. P.; ILHA, M. R. S.; BREITSAMETER, I.; FARACO, C. S. Clinical and pathological study of feline mammary fibroadenomatous change associated with depot medroxyprogesterone acetate therapy. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 2, p. 270-274, 2004.

LUOH, S. W.; RAMSEY, B.; NEWELL, A. H.; TROXELL, M.; HU, Z.; CHIN, K.; SPELLMAN, P.; OLSON, S.; KEENAN, E. HER-2 gene amplification in human breast cancer without concurrent HER-2 over-expression. **Springerplus**, v. 2, n. 1, p. 386, 2013

MACEWEN, E. G.; HAYES, A. A.; HARVEY, H. J.; PATNAIK, A. K.; MOONEY, S.; PASSE, S. Prognostic factors for feline mammary tumors. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 185, n. 2, p. 201-204, 1984.

MACEWEN, E. G. Spontaneous tumors in dogs and cats: models for the study of cancer biology and treatment. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 9, n. 2, p. 125-136, 1990.

MANESH, J. Y. Y.; SHAFIEE, R.; PEDRAM, B.; MALAYERI, H. Z.; MOHAJER, S.; AHMADI, S.; JAVANBAKHT, J.; MOKARIZADEH, A.; KHADIVAR F. Improving the

diagnosis, treatment, and biology patterns of feline mammary intraepithelial lesions: a potential model for human breast masses with evidence from epidemiologic and cytohistopathologic studies. **Tumor Biology**, v. 35, n. 12, p. 12109-12117, 2014.

MAULDIN, G. N.; MATUS, R. E.; PATNAIK, A. K.; BOND, B. R.; MOONEY, S. C. Efficacy and toxicity of doxorubicin and cyclophosphamide used in the treatment of selected malignant tumors in 23 cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 2, n. 2, p. 60-65, 1988.

MCNEILL, C. J.; SORENMO, K. U.; SHOFER, F. S.; GIBEON, L.; DURHAM, A. C.; BARBER, L. G. BAEZ, J. L.; OVERLEY, B. Evaluation of Adjuvant Doxorubicin-Based Chemotherapy for the Treatment of Feline Mammary Carcinoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, n. 1, p. 123-129, 2009.

MENG, S.; TRIPATHY, D.; SHETE, S.; ASHFAQ, R.; HALEY, B.; PERKINS, S.; FRENKEL, E. HOOVERH, S.; LEITCHH, M.; CLIFFORDI, E.; VITETTAA, E.; MORRISONJ, L.; HERLYNK, D.; TERSTAPPENL, L. W. M. M.; FLEMINGM, T.; FEHMN, T.; TUCKERA, T.; LANEA, N.; WANGA J.; UHR, J. HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 25, p. 9393-9398, 2004.

MILLANTA, F.; CALANDRELLA, M.; BARI, G.; NICCOLINI, M.; VANNOZZI, I.; POLI, A. Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. **Research in Veterinary Science**, v. 79, n. 3, p. 225-232, 2005.

MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In: Meuten, D.J. **Tumors in Domestic Animals**, 4.ed. Ames: Iowa State Press, 2002, cap., 12 p. 575-606.

MISDORP W.; ELSE R.W.; HELLMÉN E.; LIPSCOMB T.P. Histological classification of mammary tumors of the dog and cat. In: Ibid. International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals. 2 ed., v.7, Geneva: World Health Organization, 1999.

MISDORP, W.; ROMIJN, A.; HART, A. A. Feline mammary tumors: a case-control study of hormonal factors. **Anticancer Research**, v. 11, n. 5, p. 1793-1797, 1990.

MILLS, S. W.; MUSIL, K. M.; DAVIES, J. L.; HENDRICK, S.; DUNCAN, C.; JACKSON, M. L. KIDNEY, B.; PHILIBERT, H.; WOBESER, B. K.; SIMKO, E. Prognostic value of histologic grading for feline mammary carcinoma: a retrospective survival analysis. **Veterinary Pathology**, v. 52, n. 2, p. 238-249, 2015.

MOLINA, R.; CIOCCA, D. R.; TANDON, A. K.; ALLRED, D. C.; CLARK, G. M.; CHAMNESS, G. C.; GULLICK, W. J.; MCGUIRE, W. L. Expression of HER-2/neu oncoprotein in human breast cancer: a comparison of immunohistochemical and western blot techniques. **Anticancer Research**, v. 12, n. 6B, p. 1965-1971, 1991.

MONTAGNA, E.; MAISONNEUVE, P.; ROTMENSZ, N.; CANCELLO, G.; IORFIDA, M.; BALDUZZI, A.; VIVIANA G. V.; VERONESI, P.; LUINI, A.; PRUNERI, G.; BOTTIGLIEIRI, L.; MASTROPASQUA, M. G.; GOLDHIRSCH, A.; VIALE, G.; COLLEONI, M. Heterogeneity of triple-negative breast cancer: histologic subtyping to inform the outcome. **Clinical Breast Cancer**, v. 13, n. 1, p. 31-39, 2013.

MORRIS, J. Mammary Tumours in the Cat Size matters, so early intervention saves lives. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 15, n. 5, p. 391-400, 2013.

NGUYEN, P. L.; TAGHIAN, A. G.; KATZ, M. S.; NIEMIERKO, A.; ABI RAAD, R. F.; BOON, W. L.; BELLON, J.R.; WONG, J. S. Breast cancer subtype approximated by estrogen receptor, progesterone receptor, and HER-2 is associated with local and distant recurrence after breast-conserving therapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 14, p. 2373-2378, 2008.

NIELSEN, S. W. Classification of tumors in dogs and cats. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 19, n. 1, p. 13-60, 1983.

NOVOSAD, C. A.; BERGMAN, P. J.; O'BRIEN, M. G.; MCKNIGHT, J. A.; CHARNEY, S. C.; SELTING, K. A.; GRAHAM, J. C.; CORREA, S. S.;

NUNES, C. B. **Avaliação do HER2 em câncer de mama: estudo das fases pré-analítica, analítica e pós-analítica das técnicas de imuno-histoquímica e hibridização in situ pela prata usando microarranjos de tecido**. 108 f. Tese (Doutorado em Patologia) – Departamento de Anatomia Patológica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

ORDÁS, J.; MILLÁN, Y.; DIOS, R.; REYMUNDO, C.; DE LAS MULAS, J. M. Proto-oncogene HER-2 in normal, dysplastic and tumorous feline mammary glands: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. **BMC Cancer**, v. 7, n. 1, p. 179, 2007.

OVERLEY, B.; SHOFER, F. S.; GOLDSCHMIDT, M. H.; SHERER, D.; SORENMO, K. U. Association between ovarihysterectomy and feline mammary carcinoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 19, n. 4, p. 560-563, 2005.

PEREIRA, P. D.; CARVALHEIRA, J.; GÄRTNER, F. Cell proliferation in feline normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissue—an immunohistochemical study. **The Veterinary Journal**, v. 168, n. 2, p. 180-185, 2004.

PÉREZ-ALENZA, M. D.; JIMÉNEZ, Á.; NIETO, A. I.; PEÑA, L. First description of feline inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical characteristics of three cases. **Breast Cancer Research**, v. 6, n. 4, p. 1, 2004.

PREZIOSI, R.; SARLI, G.; BENAZZI, C.; MANDRIOLI, L.; MARCATO, P. S. Multiparametric survival analysis of histological stage and proliferative activity in feline mammary carcinomas. **Research in veterinary science**, v. 73, n. 1, p. 53-60, 2002.

RAHARISON, F.; SAUTET, J. Lymph drainage of the mammary glands in female cats. **Journal of Morphology**, v. 267, n. 3, p. 292-299, 2006.

RASOTTO, R.; CALIARI, D.; CASTAGNARO, M.; ZANETTI, R.; ZAPPULLI, V. An Immunohistochemical study of HER-2 expression in feline mammary tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 144, n. 2, p. 170-179, 2011.

RESSEL, L.; PULEIO, R.; LORIA, G. R.; VANNOZZI, I.; MILLANTA, F.; CARACAPPA, S.; POLI, A. HER-2 expression in canine morphologically normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissues and its correlation with the clinical outcome. **Research in Veterinary Science**, v. 94, n. 2, p. 299-305, 2013.

ROMOND, E. H.; PEREZ, E. A.; BRYANT, J.; SUMAN, V. J.; GEYER JR C. E.; DAVIDSON, N. E.; SWAIN, S. M.; PISANSKY T.M.; FEHRENBACHER, L.; KUTTEH, L.A.; VOGEL, V.G.; VISSCHER, D.W.; YOTHERS G.; JENKINS, R.B.; BROWN, A.M.; DAKHIL, S.R.; MAMOUNAS, E.P.; LINGLE W.L.; KLEIN, P.M.; INGLE, J.N.; WOLMARK, N. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 16, p. 1673-1684, 2005.

ROSEN. P.P.; OBERMAN, H.A. **Tumors of mammary gland**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, p. 390, 1993.

ROSENBERG, M.P.; GIEGER, T.C. Retrospective evaluation of adjunctive doxorubicin for the treatment of feline mammary gland adenocarcinoma: 67 cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 42, n. 2, p. 110-120, 2006.

ROSS, J. S.; GRAY, G. S. Targeted therapy for cancer: the HER-2/neu and Herceptin story. **Clinical Leadership & Management Review: the Journal of CLMA**, v. 17, n. 6, p. 333-340, 2002.

SCHNITT, S. J. Breast cancer in the 21st century: new opportunities and new challenges. **Modern Pathology**, v. 14, n. 3, p. 213-218, 2001.

SEIXAS, F.; PALMEIRA, C.; PIRES, M. A.; BENTO, M. J.; LOPES, C. Grade is an independent prognostic factor for feline mammary carcinomas: a clinicopathological and survival analysis. **The Veterinary Journal**, v. 187, n. 1, p. 65-71, 2011.

SHAFIEE, R.; JAVANBAKHT, J.; ATYABI, N.; BAHRAMI, A.; KHERADMAND, D.; SAFAEI, R.; KHADIVAR, F.; HOSSEINI, E. Comparative value of clinical, cytological, and histopathological features in feline mammary gland tumors; an experimental model for the study of human breast cancer. **Diagnostic Pathology**, v. 8, n. 1, p. 1, 2013.

SILVA, M. N.; LEITE, J. S.; MELLO, M. F.; SILVA, K. V.; CORGOZINHO, K. B.; DE SOUZA, H. J. CUNHA, S.C.S; FERREIRA, A.M. R. Histologic evaluation of Ki-67 and cleaved caspase-3 expression in feline mammary carcinoma. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, p. 1-6, 2016.

SILVER, I. A. Symposium on Mammary Neoplasia in the Dog and Cat - The Anatomy of the Mammary Gland of the Dog and Cat. **Journal of Small Animal Practice**, v. 7, n. 11, p. 689-696, 1966.

SOARES, M.; CORREIA, J.; RODRIGUES, P.; SIMÕES, M.; DE MATOS, A.; FERREIRA, F. Feline HER2 protein expression levels and gene status in feline mammary carcinoma: optimization of immunohistochemistry (IHC) and in situ hybridization (ISH) techniques. **Microscopy and Microanalysis**, v. 19, n. 04, p. 876-882, 2013.

SLAMON, D. J.; GODOLPHIN, W.; JONES, L. A.; HOLT, J. A.; WONG, S. G. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. **Science**, v. 244, n. 4905, p. 707-712, 1989.

TOGNI, M.; MASUDA, E. K.; KOMMERS, G. D.; FIGHERA, R. A.; IRIGOYEN, L. F. Estudo retrospectivo de 207 casos de tumores mamários em gatas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 3, p. 353-358, 2013.

VISTE, J. R.; MYERS, S. L.; SINGH, B.; SIMKO, E. Feline mammary adenocarcinoma: tumor size as a prognostic indicator. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 43, n. 1, p. 33, 2002.

WOLFF, A. C.; HAMMOND, M. E. H.; SCHWARTZ, J. N.; HAGERTY, K. L.; ALLRED, D. C.; COTE, R. J.; MCSHANE, L. M. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 131, n. 1, p. 18-43, 2007.

WOLFF, A. C.; HAMMOND, M. E. H.; HICKS, D. G.; DOWSETT, M.; MCSHANE, L. M.; ALLISON, K. H. BARLETT, J.M.S.; BILOUS, M. FITZGIBBONS, P.; HANNA, W.; JENKINS, R.B.; MANGU, P.B.; PAIK, S. PEREZ. E.A.; PRESS, M. F.; SPEARS, P. A.; VANCE, G.H.; VIALE, G. HAYES, D. F. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 31, p. 3997-4013, 2013.

ZAPPULLI, V.; DE ZAN, G.; CARDAZZO, B.; BARGELLONI, L.; CASTAGNARO, M. Feline mammary tumours in comparative oncology. **Journal of Dairy Research**, v. 72, n. S1, p. 98-106, 2005.

**Capítulo 2 - Expressão de Her-2 em lesões mamárias de gatas e relação com
fatores de prognóstico**
Artigo nas normas da revista Pesquisa Veterinária Brasileira

Expressão de Her-2 em neoplasias mamárias de gatas e avaliação de seu potencial prognóstico¹

Lígia F. Gundim^{2*}, Taís M. Wilson², William T. Blanca², Nicolle P. Soares², Mariana R. Castro³, Igor P. Castro², Alessandra A. Medeiros-Ronchi³

ABSTRACT.– GUNDIM L.F., WILSON T.N., BLANCA W.T., SOARES N.P., CASTRO M.R., IGOR DE PAULA CASTRO MEDEIROS-RONCHI A.A. 2017. [**Her-2 expression in feline mammary tumors and evaluation of its prognostic potential.**] Expressão de Her-2 em neoplasias mamárias de gatas e avaliação de seu potencial prognóstico. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório de Patologia Animal, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Mato Grosso 3289, Uberlândia, MG 38400-900, Brazil. E-mail: ligiagundim@gmail.com

ABSTRACT - Mammary neoplasms are the third most frequent type of neoplasm in felines and the search for prognostic factors for this type of tumor in cats has intensified in the last years, due to its high frequency and relevance in the cat clinic. Among the immunohistochemical markers used for prognosis, the Human Epidermal Growth Factor Receptor type 2 (Her-2) receptor, which in women is associated with a worse prognosis, stands out. The objective of this study was to evaluate the expression of Her-2 in hyperplasias and benign and malignant neoplasms of cats and to relate the expression to the type and histological grade of mammary carcinomas. Thirty-eight cases of neoplasia and mammary hyperplasia of cats were selected from 2006 to 2016. From the protocols selected, epidemiological information and macroscopic characteristics of mammary lesions were obtained. Tumors were individually classified and graded histologically by two pathologists. Her-2 expression was determined by immunohistochemistry, using a semi-quantitative analysis of the slides according to the Hercepest (Dako) recommended score. The Chi-square test (χ^2) was used to evaluate the relationship between Her-2 expression and type of mammary lesion, histological types of carcinoma and histological grade ($P < 0.05$). The mean age of the animals was 8.5 years and young cats were affected only by benign hyperplasias and neoplasms. Undefined cats were more affected (84.37%), followed by Siamese (9.37%) and Persian (6.25%). Regarding the histological classification, 18.42% of the mammary lesions were classified as hyperplasia, 18.42% as adenoma and 63.16% were classified as carcinoma. The most common type of carcinoma was tubulopapillary carcinoma (66.7%), followed by solid carcinoma (25%) and cribriform carcinoma (8.33%). Her-2 overexpression was observed in 4 samples (16.7%) of tubulopapillary carcinoma, two carcinomas grade I and two degrees II, but there was no relationship between Her-2 expression and type of mammary lesion ($P = 0.3127$), carcinoma type (0.3446) or histological grade (0.6485). It is concluded that the percentage of female mammary carcinomas expressing Her-2 is lower than in women's breast cancer and there was no relation between grade and histological type and Her-2 expression.

INDEX TERMS: c-erbB-2/neu, feline, imunohistochemistry, mammary tumor.

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Av. Mato Grosso 3289, bloco 2S, Bairro Umuarama, Uberlândia, MG 38405314, Brazil. Pesquisa de mestrado com apoio CAPES e FAPEMIG. *Autor para correspondência: ligiagundim@gmail.com.

³ Laboratório de Patologia Animal, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Av. Mato Grosso 3289, bloco 2S, Bairro Umuarama, Uberlândia, MG 38405314, Brazil.

RESUMO.– As neoplasias mamárias são o terceiro tipo mais frequente de neoplasias em felinos e a busca por fatores prognósticos para este tipo de tumor nas gatas tem se intensificado nos últimos anos, dada sua alta frequência e relevância na clínica de felinos. Dentre os marcadores imunohistoquímicos utilizados para prognóstico destaca-se o receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor type 2 – Her-2) que em mulheres está associado a um pior prognóstico. Objetivou-se avaliar a expressão de Her-2 em hiperplasias e neoplasias mamárias, benignas e malignas, de gatas e relacionar a expressão ao tipo e grau histológico dos carcinomas mamários. Foram selecionados 38 casos de neoplasias e hiperplasias mamárias de gatas, no período de 2006 a 2016. A partir dos protocolos selecionados obteve-se informações epidemiológicas e características macroscópicas das lesões nas mamas. Os tumores foram individualmente classificados e graduados histologicamente por dois patologistas. A expressão de Her-2 foi determinada por imunohistoquímica, por meio de análise semi quantitativa das lâminas conforme escore recomendado pelo Herceptest (Dako). Utilizou-se Teste Qui-quadrado (χ^2) para avaliação da relação entre expressão de Her-2 e tipo de lesão mamária, tipos histológicos de carcinoma e grau histológico ($P < 0,05$). A idade média dos animais foi de 8,5 anos e as gatas jovens foram acometidas somente por hiperplasias e neoplasias benignas. Gatas sem raça definida foram mais acometidas (84,37%), seguida por siamês (9,37%) e persa (6,25%). Quanto à classificação histológica, 18,42% das lesões mamárias foram classificadas como hiperplasia, 18,42% como adenoma e 63,16% foram classificadas como carcinoma. O tipo de carcinoma mais comum foi o carcinoma tubulopapilar (66,7%), seguido por carcinoma sólido (25%) e carcinoma cribriforme (8,33%). Observou-se superexpressão de Her-2 em 4 amostras (16,7%) de carcinoma do tipo tubulopapilar, sendo dois carcinomas grau I e dois graduação II, todavia não houve relação entre a expressão de Her-2 e o tipo de lesão mamária ($p = 0,3127$), tipo de carcinoma (0,3467) ou grau histológico (0,6485). Conclui-se que o percentual de carcinomas mamários de gatas que expressam Her-2 é menor que no câncer de mama da mulher e não houve relação entre grau e tipo histológico e expressão de Her-2.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: c-erbB-2/neu, felino, imunohistoquímica, tumor de mama.

INTRODUÇÃO

As neoplasias mamárias são o terceiro tipo tumoral mais frequente em felinos e acometem mais frequentemente fêmeas, adultas, não castradas e não há predisposição racial (Lana et al. 2007). Vários fatores prognósticos já estão estabelecidos para estes tumores, tais como: estágio clínico, tamanho tumoral (Ito et al. 1996), grau histológico (Castagnaro et al. 1998, Hughes e Dobson 2012, De Campos et al. 2015), taxa de mitose (Preziosi et al. 2002, Hughes e Dobson 2012) e invasão linfovascular (Seixas et al. 2011). Entretanto, nos últimos anos, marcadores imunohistoquímicos estão sendo explorados para melhor compreensão da patogênese molecular nas neoplasias de felinos (Hughes e Dobson 2012).

Neste sentido, o receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor type 2 – Her-2), um proto-oncogene muito empregado em câncer de mama em mulheres, tem sido estudado como fator prognóstico e preditivo de tumores mamários em cães e gatos. Em mulheres, sua superexpressão está relacionada a menor tempo livre da doença, maior risco de metástases e maior resistência a quimioterápicos (Eccles, 2011) e seu efeito na carcinogênese está ligado à inibição da apoptose, indução da proliferação celular e angiogênese (Gleich e Salamone, 2002).

Os carcinomas mamários em gatas apresentam características histológicas (Pérez-Alenza et al. 2004), metastáticas (Macewen 1990) e de dependência hormonal (De Las Mulas et al. 2000) semelhantes a neoplasias mamárias em mulheres, indicando que a gata pode ser um modelo animal adequado para o câncer de mama em mulheres (De Maria et al. 2005). Além

disto, a expressão de Her-2 poderia ser utilizada como fator preditivo para seleção de gatas para tratamento com fármacos anti-Her-2 (como o trastuzumab), à semelhança do que ocorre em mulheres, apesar do alto custo, e assim ser uma alternativa para tratamento das neoplasias mamárias em gatas.

Estudos indicam que a expressão de Her-2 em gatas está associada à maior tamanho do tumor, maior grau histológico (Ordás et al. 2007) e menor sobrevida (Ordás et al. 2007, De Campos et al. 2015). Entretanto, alguns autores afirmam que, ao contrário do que ocorre na mulher, o Her-2 pode não estar envolvido na carcinogênese dos tumores mamários nas gatas e seu valor como fator de prognóstico em gatas é discutido, pois tanto as hiperplasias quanto os tumores malignos e benignos expressam Her-2 (Rasotto et al. 2011).

Assim, uma vez que estudos abordando expressão de Her-2 em gatas ainda são escassos e tais estudos se fazem necessários para elucidar seu papel como fator prognóstico, objetivou-se avaliar a imunoexpressão de Her-2 em hiperplasias, neoplasias benignas e malignas em gatas e relacionar essa imunoexpressão ao tipo e grau histológico, importantes parâmetros histológicos para carcinomas mamários.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras. Foram revisados os protocolos do Laboratório de Patologia Animal do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia, entre os anos de 2006 a 2016, e selecionou-se protocolos de gatas com diagnóstico de neoplasia mamária (maligna ou benigna) ou lesões não neoplásicas (hiperplasias ou displasias).

Dados epidemiológicos (idade, sexo, raça) foram coletados a partir dos protocolos, assim como características clinicopatológicas como localização e o tamanho das lesões. Quanto ao tamanho, considerou-se T1 tumores menores que 2cm, T2 tumores entre 2 e 3 cm e T3 tumores maiores que 3cm (Mc Neil et al. 2009).

As gatas foram classificadas quanto à faixa etária em jovens (menos de ano), adultos (de um a oito anos) e idosos (acima de oito anos de idade) (Togni et al. 2013).

Histopatologia. As lâminas histológicas, contendo fragmentos de tecido mamário dos casos selecionados, foram revisadas por dois patologistas e classificadas de acordo com Misdorp et al. (1999) e o grau histológico foi atribuído segundo Elston e Ellis (1993).

Imunohistoquímica. Lâminas contendo poli-L-lisina (Sigma Aldrich) foram submetidas à secagem em temperatura ambiente (25°C). Os fragmentos de mama das gatas, já inclusos em parafina, foram submetidos à corte histológico em micrótomo, na espessura de quatro µm e acondicionados em estufa a 45°C por aproximadamente 24 horas. Os cortes foram colocados sobre as lâminas previamente preparadas e então submetidos à diafanização por 20 minutos em xilol. A reidratação 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. As amostras foram então submetidas à técnica de imunohistoquímica para detecção de Her-2, segundo Ressel et al. (2013) com modificações. A recuperação antigênica por calor foi realizada em micro-ondas, em solução de ácido etilenodiamino tetra-acético dissódico (EDTA) e em seguida, as lâminas foram resfriadas. Para o bloqueio de peroxidase endógena utilizou-se peróxido de hidrogênio e em sequência os cortes foram contornados com caneta hidrofóbica (DAKO S200230) e para o bloqueio das proteínas inespecíficas utilizou-se Protein Block (DAKO X0909). O anticorpo anti Her-2 (Dakocytomation polyclonal antibody A0485) foi diluído 1:400 em soro albumina bovina (BSA) (Amresco, 0332) 1%. Os cortes receberam 100 microlitros (µl) do anticorpo diluído e foram cobertos com parafilm American National Can® e as lâminas foram incubadas *overnight* em câmara úmida. Após incubação as lâminas, utilizou-se a técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase (Dako, K069011). Após cada etapa, as lâminas foram lavadas em solução 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol (Tris-HCl). A reação foi revelada com

diaminobenzidina (Diaminobenzina, Dako- K3468-1) e as lâminas contra coradas com hematoxilina de Harris e montadas.

Como controle positivo da reação utilizou-se corte histológico de carcinoma mamário de mulher, previamente testado para expressão de Her-2 e com escore 3+, conforme Bertangolli et al. (2011). Como controle negativo, substitui-se o anticorpo primário pelo diluente do anticorpo (BSA 1%).

A expressão de Her-2 foi determinada por análise semiquantitativa, realizada a partir da verificação da marcação da membrana das células epiteliais, conforme escore recomendado pelo Herceptest (Dako). O escore 0 (negativo) foi considerado quando não havia coloração de membrana ou coloração em <10% das células tumorais; escore 1+ (fraco) quando havia coloração fraca e incompleta da membrana em >10% das células tumorais; escore 2+ (moderadamente positivo) quando havia coloração fraca e moderadamente completa da membrana em >10% das células tumorais; escore 3+ (fortemente positivo) quando havia forte e completa coloração da membrana em >10% das células tumorais. As imunomarcações de secreções lúminais, em epitélio normal e acúmulos extracelulares foram desconsideradas. As amostras com escore 2+ e 3+ foram consideradas positivas.

Análise Estatística. A relação entre expressão de Her-2 e tipo de lesão mamária (hiperplasia, adenoma e carcinoma), tipo histológico de carcinoma (tubulopapilar, sólido, cribriforme) e grau histológico foi determinada pelo teste Qui-quadrado (χ^2) por meio do programa Action 2.5 em Microsoft Excel 2007 ($P < 0,05$).

RESULTADOS

Foram selecionados 38 protocolos de gatas, sendo que dois não possuíam informação de idade e em seis não constava a raça do animal. A idade média das gatas foi de 8,5 anos, variando de 6 meses a 15 anos, sendo quatro animais jovens (11,11%), oito gatas adultas (22,22%) e 24 idosas (66,67%). As gatas jovens foram acometidas somente por hiperplasias (3/4; 75%) e tumor benigno (1/4; 25%), assim como a maioria das gatas adultas (5/8, 62,5%). Já as gatas idosas foram acometidas por carcinomas em sua maioria (20/24, 83,33%) (Quadro 1).

Com respeito às raças, lesões mamárias ocorreram com maior frequência em gatas sem raça definida (SRD) (84,37%), seguido da raça siamesa (9,37%) e persa (6,25%). Das 38 lesões mamárias, 24 (63,16%) eram tumores malignos e dentre estes, o carcinoma tubulopapilar foi o mais frequente (66,67%) (Quadro 1).

Em 11 protocolos de gatas com carcinoma havia informações a respeito do tamanho tumoral, sendo três tumores classificados como T1 (27,27%), quatro em T2 (36,36%) e quatro como T3 (36,36%). Sobre a localização, três (10%) se encontravam na mama torácica cranial, dois (6,67%) na glândula torácica caudal, seis (20%) na abdominal cranial, oito (26,67%) na glândula abdominal caudal, 11 (36,67%) animais apresentavam tumores em várias mamas e em 8 fichas este dado não estava disponível.

Na graduação histológica, apenas os carcinomas foram graduados, totalizando 24 amostras. Dez carcinomas receberam grau I (41,67%), sendo que todos eram do tipo tubulopapilar; 10 receberam grau II (41,67%), sendo seis classificados como carcinoma tubulopapilar (60%), 3 classificados como carcinoma sólido (30%) e 1 como carcinoma cribriforme (10%). Apenas quatro carcinomas receberam grau III (16,67%), sendo três do tipo carcinoma sólido (75%) e um carcinoma cribriforme (25%).

Quanto à expressão de Her-2, das 24 amostras de carcinoma, quatro amostras (16,7%) foram positivas, sendo que uma amostra recebeu escore 3+ e três receberam escore 2+ (Figura 1). Todos os carcinomas que expressaram Her-2 eram do tipo tubulopapilar e dois carcinomas eram grau I (50%) e dois grau II (50%). A marcação de membrana ocorreu exclusivamente nas células epiteliais tumorais, não houve marcação de células epiteliais normais e em alguns casos

verificou-se fraca marcação de citoplasma. Nenhuma amostra de neoplasia benigna ou hiperplasia apresentou marcação de membrana para Her-2.

Não houve relação entre imunomarcação e tipo de lesão mamária (carcinomas, adenomas ou hiperplasias) ($p=0.3127$), tipo histológico de carcinoma (tubulopapilar, sólido, cribriforme) ($p=0,3467$) e grau histológico ($p=0,6485$).

DISCUSSÃO

As gatas jovens foram mais acometidas por hiperplasias (75%), fato que pode estar associado à etiologia das hiperplasias fibroepiteliais ligada à progestágenos naturais, produzidos a partir do primeiro cio (Hayden et al. 1981). Já a média de idade de gatas acometidas por carcinomas (10,31 anos) condiz com outros estudos que descrevem que esta média varia entre 10 a 12 anos (Millanta et al. 2006, Lana et al. 2007, Kustritz 2007, Cunha et al. 2016). Em gatas idosas, é mais comum a ocorrência de carcinomas que de tumores benignos (Hayes, 1985) e embora haja indicação de que o prognóstico é pior em gatas mais velhas, a idade não apresentou associação significativa com sobrevida pós-cirúrgica (Castagnaro et al. 1998).

Gatas de pelo curto são mais acometidas por tumores mamários (Seixas et al. 2011, Manesh et al. 2014), assim como as raças siamesa (Hayes et al. 1981) e persa (Seixas et al. 2011). Estas últimas raças também foram observadas no presente estudo, apesar das gatas SRD terem sido as mais frequentemente acometidas por tumores mamários. A maior ocorrência em gatas SRD pode estar associada ao estrato populacional atendido no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia e diferenças raciais entre populações estudadas torna difícil o estabelecimento dessa relação. Togni et al. (2013) e Cunha et al. (2016), em estudos realizados no Brasil, também relataram maior ocorrência em gatas sem raça definida.

Quanto ao tamanho das massas, a maioria (72,72%) apresentava mais que 2 centímetros, assim como relatado por Manesh et al. (2014) que observaram 33,33% das massas maiores que 3 centímetros de diâmetro. Já Togni et al. (2013) e De Campos et al. (2015) relataram que tumores menores que 2 centímetros foram mais frequentes em gatas. O tamanho da massa tumoral é considerado importante fator de prognóstico pois tumores maiores apresentam maior número de divisões celulares e maior probabilidade de progressão para comportamento maligno, devido ao acúmulo de mutações (Matos et al. 2012). E ainda, sua relação já foi estabelecida com a sobrevida, onde gatas com massas maiores apresentam menor sobrevida (Ito et al. 1996).

Com respeito à localização, as mamas abdominais foram mais acometidas, assim como relatado por De Campos et al. (2015). Alguns autores utilizam a denominação das mamas em torácicas, abdominais e inguinais, conforme Dyce et al. (2004), relatando maior ocorrência de tumores nas glândulas abdominais (Shafiee et al. 2013, Manesh et al. 2014) e inguinais (Cunha et al. 2016).

Tumores malignos foram mais frequentes que lesões benignas e o carcinoma tubulopapilar foi o mais frequente. Na Itália, considerando apenas as neoplasias, 88% dos tumores foram classificados como carcinomas (Rasotto et al. 2011); e Maniscalco et al. (2012), considerando as hiperplasias como lesões benignas, verificaram que 69,2% das amostras eram malignas.

Quanto à classificação dos carcinomas, a maioria dos autores relata o carcinoma tubulopapilar como o mais frequente (Togni et al. 2013), seguido pelo carcinoma sólido (Pereira et al. 2004, Millanta et al. 2006, Maniscalco et al. 2012, De Campos et al. 2015), assim como neste trabalho. Todavia, em alguns trabalhos o carcinoma cribriforme não foi citado (Pereira et al. 2004, Millanta et al. 2006) e em outro foram citados outros tipos histológicos, como carcinoma mucinoso, rico em glicogênio e carcinossarcoma (De Campos et al. 2015). As neoplasias classificadas como carcinoma tubulopapilar expressam mais Ki-67 que os carcinomas sólido e cribriforme (Pereira et al. 2004), apontando maior índice proliferativo.

Além disso, gatas com carcinoma cribriforme são as que apresentam menor sobrevida, seguido por carcinoma sólido e carcinoma tubulopapilar (Seixas et al. 2011, Mills et al. 2015)

A classificação histológica das neoplasias deve ser acompanhada da graduação histológica para melhor avaliação prognóstica (Hughes e Dobson 2012). No presente estudo, a maioria dos tumores (84%) apresentou grau I e II. Outros autores também citam que carcinomas de gatas são, em sua maioria, bem diferenciados (grau I e II) (Silva 2016), ou ainda que os carcinomas mostram distribuição semelhante entre os graus (Rasotto et al. 2011, De Campos et al. 2015). Filgueira et al. (2014) verificaram que metástases à distância podem ocorrer em gatas com carcinomas tubulares e sólidos, moderadamente diferenciados e indiferenciados, sugerindo que a graduação associada ao tipo histológico podem predizer a ocorrência de metástases.

Estudos anteriores relataram a superexpressão de Her-2 em gatas variando entre 12,3% a 40% (De Maria et al. 2005, Ordás et al. 2007, Rasotto et al. 2011, De Campos et al. 2015) e, neste trabalho, verificou-se que 16,7% dos carcinomas apresentaram superexpressão. A variação nos resultados pode ocorrer devido à falta de padronização da técnica imunohistoquímica (Matos et al. 2012, De Campos et al. 2015) e ao uso de anticorpos humanos que podem apresentar baixa especificidade (Matos et al. 2012). No entanto, Soares et al. (2012) testando vários protocolos e anticorpos para verificação da expressão de Her-2 demonstrou que o clone usado no presente estudo (A0485) foi o que apresentou melhor resultado.

Apesar de trabalhos anteriores relatarem associação de superexpressão de Her-2 com maior tamanho tumoral, maior grau histológico e ausência de expressão de receptores hormonais (Ordás et al. 2007) e sobrevida global (Millanta et al. 2006, De Campos et al. 2015), esta associação não foi observada no presente estudo. Outros estudos também mostraram ausência de relação entre superexpressão de Her-2 e classificação histopatológica do tumor, grau de malignidade, índice de Ki-67, tamanho do tumor, presença de metástases regionais e idade da gata ao diagnóstico (Soares et al. 2012).

No presente estudo, os tumores benignos e as hiperplasias não apresentaram superexpressão de Her-2, assim como em estudo realizado na Espanha (Ordás, 2007). Em cadelas, Ferreira et al. (2014) relataram que hiperplasias ductais atípicas associadas a carcinomas mamários caninos apresentaram fraca expressão da proteína Her-2 e não tiveram amplificação do seu gene codificador detectado pela técnica de hibridização *in situ*. Por outro lado, estudo realizado na Itália descreveu 6,8% das hiperplasias e 10% dos adenomas como positivos e sugere que a superexpressão de Her-2 pode estar associada ao crescimento destas lesões benignas (Rasotto et al. 2011).

CONCLUSÕES

Apesar da expressão de Her-2 ser um importante fator de prognóstico para mulheres portadoras de tumor de mama, e da similaridade entre tumores de mama na mulher e na gata, o percentual de carcinomas mamários de gatas que expressam Her-2 é menor que no câncer de mama da mulher. Além disto, não foi possível estabelecer relação entre grau e tipo histológico e expressão de Her-2. Com relação às lesões mamárias benignas em gatas, estas aparentemente não expressam Her-2.

Agradecimentos. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível (Capes) pela concessão de bolsa de mestrado.

REFERÊNCIAS

Bertagnolli A.C., Ferreira E., Dias E.J. & Cassali, G.D. 2011. Canine mammary mixed tumours: immunohistochemical expressions of EGFR and HER-2. Aust. Vet. Jour. 89(8):312-317.

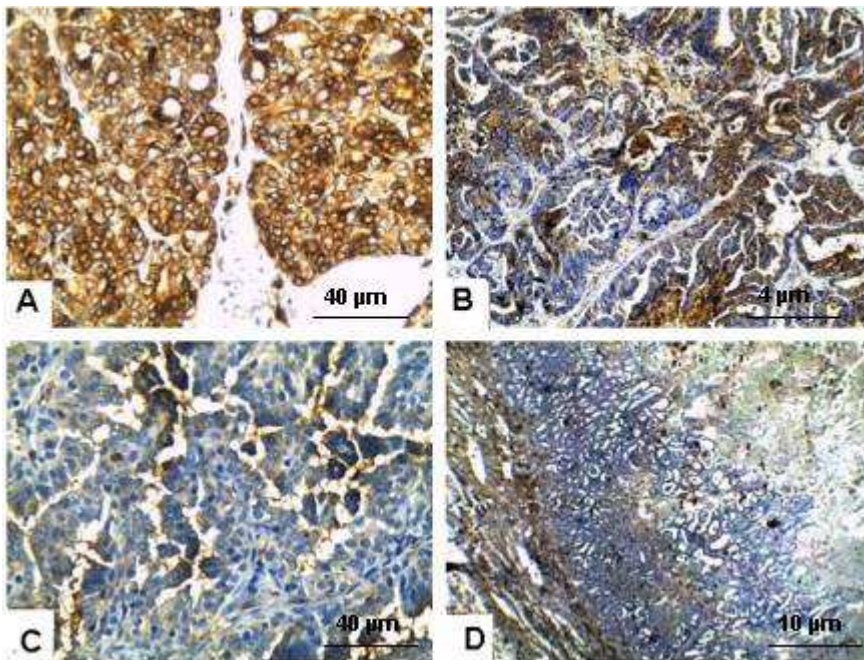
- Castagnaro M., Casalone C., Bozzetta E., De Maria R., Biolatti B. & Caramelli, M. 1998. Tumour grading and the one-year post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. *Jour. of Comp. Path.* 119(3):263-275.
- Cunha S., Corgozinho K., Justen H., Silva K., Leite J. & Ferreira, A. M. 2016. Survival and disease-free interval of cats with mammary carcinoma treated with chain mastectomy. *Acta Scie. Vet.* 44:01-08.
- De Campos C.B., Damasceno K.A., Gamba C.O., Ribeiro A.M., Machado C J., Lavalle G.E. & Cassali G.D. 2015. Evaluation of prognostic factors and survival rates in malignant feline mammary gland neoplasms. *Jour. Fel. Med. Surg.* 18(12):1003-1012.
- De las Mulas J.M., Van Niel M., Millan Y., Blankenstein M. A., Van Mil, F & Misdorp, W. 2000. Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in feline mammary gland benign and malignant lesions: comparison with biochemical assay. *Dom. Anim. End.* 18(1):111-125.
- De Maria R., Olivero M., Iussich S., Nakaichi M., Murata T., Biolatti B. & Di Renzo M.F. 2005. Spontaneous feline mammary carcinoma is a model of HER2 overexpressing poor prognosis human breast cancer. *Canc. Res.* 65(3):907-912.
- Dyce M., Sack W., & Wensing C. 2004. Glândula mamária. *Tratado de Anatomia Veterinária*. Rio de Janeiro: Elsevier, Cap, 10:357-358.
- Eccles S.A. 2011. The epidermal growth factor receptor/Erb-B/HER family in normal and malignant breast biology. *Intern. Jour. Dev. Bio.* 55(7-8-9):685-696.
- Elston E. W. & Ellis I. O. 1993. Method for grading breast cancer. *Jour. of Clin. Path.* 46(2):189.
- Ferreira E., Bertagnolli A.C., Gobbi H. & Cassali, G.D. 2014. HER-2 gene expression in atypical ductal hyperplasia associated with canine mammary carcinomas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoo.* 66(2):609-612.
- Filgueira K. D., da Costa Reis P. F. C., de Macêdo L. B., de Medeiros Oliveira I. V. P., Pimentel M. M. L. & Júnior, A. R. 2015. Comportamento metastático das neoplasias mamárias malignas da espécie felina. *Acta Vet. Bras.* 8(3):209-214.
- Gleich L.L. & Salamone F.N. 2002. Molecular genetics of head and neck cancer. *Can. Cont.* 9(5): 369-378.
- Hayes Jr. H.M., Milne K.L. & Mandell, C. P. 1985. Epidemiological features of feline mammary carcinoma. *The Vet. Rec.* 108(22):476-479.
- Hayden D. W., Johnston S.D., Kiang D.T., Johnson, K H. & Barnes D.M. 1981. Feline mammary hypertrophy/fibroadenoma complex: clinical and hormonal aspects. *Amer. Jour. Vet. Res.* 42(10):1699-1703.
- Hughes K. & Dobson J.M. 2012. Prognostic histopathological and molecular markers in feline mammary neoplasia. *The Vet. Jour.* 194 (1):19-26.
- Ito T., Kadosawa T., Mochizuki M. Matsunaga S. Nishimura R. & Sasaki N. 1996. Prognosis of malignant mammary tumor in 53 cats. *Jour. Vet. Med. Scie.*, 58(8): 723-726.
- Kustritz M.V.R. 2007. Determining the optimal age for gonadectomy of dogs and cats. *Jour. Am. Vet. Med. Assoc.* 231 (11):1665-1675.
- Lana S.E., Rutteman G.R. & Withrow S.J. 2007. Tumors of the mammary gland. *Small animal clinical oncology*, 4: 619-636.
- MacEwen E.G. 1990. Spontaneous tumors in dogs and cats: models for the study of cancer biology and treatment. *Canc. and Met. Rev.* 9(2):125-136.
- Manesh J.Y.Y., Shafiee R., Pedram B., Malayeri H.Z., Mohajer S., Ahmadi S. & Khadivar F. 2014. Improving the diagnosis, treatment, and biology patterns of feline mammary intraepithelial lesions: a potential model for human breast masses with evidence from epidemiologic and cytohistopathologic studies. *Tumor Bio.* 35(12):12109-12117.
- Maniscalco L., Iussich S., de las Mulas J.M., Millán Y., Biolatti B., Sasaki N. & De Maria R. 2012. Activation of AKT in feline mammary carcinoma: a new prognostic factor for feline mammary tumours. *The Vet. Jour.* 191(1):65-71.

- Matos A.J.F., Baptista C.S., Gärtner M.F. & Rutteman GR. 2012. Prognostic studies of canine and feline mammary tumours: the need for standardized procedures. *The Vet. Jour.* 193(1):24-31.
- McNeill C.J., Sorenmo K.U., Shofer F.S., Gibeon L., Durham AC., Barber LG. & Overley, B. 2009. Evaluation of Adjuvant Doxorubicin-Based Chemotherapy for the Treatment of Feline Mammary Carcinoma. *Jour. Vet. Int. Med.* 23(1):123-129.
- Millanta F., Citi S., Della Santa D., Porciani M. & Poli A. 2006. COX-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. *Brea. Can. Res. Treat.* 98(1):115-120.
- Mills S. W., Musil K.M., Davies J.L., Hendrick S., Duncan C., Jackson M.L. & Simko, E. 2015. Prognostic Value of Histologic Grading for Feline Mammary Carcinoma A Retrospective Survival Analysis. *Vet. Pat.* 52(2):238-249.
- Misdorp W. (Ed.).1999. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. Armed Forces Institute of Pathology: American Registry of Pathology: World Health Organization Collaborating Center for Comparative Oncology.
- Ordás J., Millán Y., Dios R. Reymundo C. & de las Mulas J.M. 2007. Proto-oncogene HER-2 in normal, dysplastic and tumorous feline mammary glands: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *BMC Can.* 7(1):179.
- Pérez-Alenza M.D., Jiménez Á., Nieto A.I. & Peña, L. 2004. First description of feline inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical characteristics of three cases. *Breast Can. Res.* 6(4):R300.
- Preziosi R., Sarli G., Benazzi C., Mandrioli L. & Marcato P.S. 2002. Multiparametric survival analysis of histological stage and proliferative activity in feline mammary carcinomas. *Res. Vet. Scie.* 73(1):53-60.
- Rasotto R., Caliarì D., Castagnaro M., Zanetti R. & Zappulli, V. 2011. An Immunohistochemical study of HER-2 expression in feline mammary tumours. *Jour. Comp. Path.* 144(2):170-179.
- Ressel L., Puleio R., Loria G.R., Vannozzi I., Millanta F., Caracappa S. & Poli A. 2013. HER-2 expression in canine morphologically normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissues and its correlation with the clinical outcome. *Res. Vet. Scie.* 94(2):299-305.
- Seixas F., Palmeira C., Pires M.A., Bento M.J. & Lopes, C. 2011. Grade is an independent prognostic factor for feline mammary carcinomas: a clinicopathological and survival analysis. *The Vet. Jour.* 187(1):65-71.
- Togni M., Masuda E.K., Kommers G.D., Figuera R.A. & Irigoyen L.F. 2013. Estudo retrospectivo de 207 casos de tumores mamários em gatas. *Pesq. Vet. Bras.* 33(3):353-358.
- Shafiee R., Javanbakht J., Atyabi N., Bahrami A., Kheradmand D., Safaei R. & Hosseini E. 2013. Comparative value of clinical, cytological, and histopathological features in feline mammary gland tumors; an experimental model for the study of human breast cancer. *Diag. Path.* 8(1):136.
- Pereira P.D., Carvalheira J. & Gärtner F. 2004. Cell proliferation in feline normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissue—an immunohistochemical study. *The Vet. Jour.* 168(2):180-185.
- Silva M.J.D.C.S. 2016. Clinical and molecular characterization of feline mammary carcinomas overexpressing HER2 proto-oncogene (FMC-HER2+): new strategies for effective diagnostic and cancer therapy.
- Soares M., Correia J., Carvalho S. & Ferreira, F. 2012 Avaliação da expressão de fHER2 em tumores mamários felinos e sua correlação com variáveis clínicopatológicas. *Rev. Port. Ciên. Vet.* 111(583):191-198

Figura 1 – Expressão de Her-2 em lesões mamárias de gatas por meio de IHQ. (A) Carcinoma tubulopapilar, escore 3+ (forte e completa coloração da membrana em >10% das células tumorais), 40x. (B) Carcinoma tubulopapilar, escore 2+ (coloração fraca e moderadamente

completa da membrana em >10% das células tumorais), 4x. (C) Hiperplasia lobular, escore 1+ (coloração fraca e incompleta da membrana em >10% das células tumorais), 10x. (D) Carcinoma tubulopapilar, escore 0 (ausência de coloração de membrana ou coloração em <10% das células tumorais), 10x. Contracoloração com hematoxilina de Harris.

Quadro 1- Frequência de lesões mamárias de gatas de acordo com a idade e raça.



Quadro 1- Frequência de lesões mamárias de gatas de acordo com a idade e raça.

Tipo histológico	Número/ Frequência	Idade				Raça	
		Jovem (n=4)	Adulta (n=8)	Idosa (n=24)	SRD* (n= 27)	Persa (n=2)	Siamês (n=3)
Hiperplasia	7 (18,42%)	3 (75%)	2 (25%)	1(4,17%)	4(14,81%)	-	2 (66,67%)
Adenoma	7 (18,42%)	1 (25%)	3 (37,5%)	3(12,5%)	5 (18,52%)	-	1 (33,33%)
Carcinoma tubulopapilar	16 (42,10%)	-	1 (12,5%)	15(62,5%)	13 (48,15%)	2 (100%)	
Carcinoma sólido	6 (15,79%)	-	2 (25%)	3 (12,5%)	4 (14,81%)	-	-
Carcinoma cribriforme	2 (5,26%)	-	-	2 (8,33%)	1 (3,70%)	-	-

* SRD: sem raça definida.

Os artigos devem ser submetidos através do Sistema Scholar One, link , com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponíveis no ato de submissão e no site da revista (www.pvb.com.br). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outro periódico. Apesar de não serem aceitas comunicações (Short communications) sob a forma de "Notas Científicas", não há limite mínimo do número de páginas do artigo enviado. Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos artigos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os artigos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (peer review). NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista é cobrada taxa de publicação (paper charge) no valor de R\$ 2.000,00 por artigo editorado, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência. 1. Os artigos devem ser organizados em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES, Agradecimentos e REFERÊNCIAS: a) o Título deve ser conciso e indicar o conteúdo do artigo; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS. b) O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente abreviar seus nomes quando compridos, mas mantendo o primeiro nome e o último sobrenome por extenso, como por exemplo: Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto (inverso, Peixoto P.V.); Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa (inverso, Riet-Correa F.). Os artigos devem ter no máximo 8 (oito) autores; c) o ABSTRACT deve ser uma versão do RESUMO em português, podendo ser mais explicativo, seguido de "INDEX TERMS" que incluem palavras do título; d) o RESUMO deve conter o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões, seguido dos "TERMOS DE INDEXAÇÃO" que incluem palavras do título; e) a INTRODUÇÃO deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do artigo; f) em MATERIAL E MÉTODOS devem ser reunidos os dados que permitam a repetição da experimentação por outros pesquisadores. Em experimentos com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local; g) em RESULTADOS deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros (em vez de Tabelas) devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente expressar dados complexos, por gráficos (=Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos; h) na DISCUSSÃO devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar artigos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los; i) as CONCLUSÕES devem basear-se somente nos resultados apresentados; j) Agradecimentos devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé; k) a Lista de REFERÊNCIAS, que só incluirá a bibliografia citada no artigo e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabética e cronologicamente, pelo sobrenome do primeiro autor, seguido dos demais autores (todos), em caixa alta e baixa, do ano, do título da publicação citada, e, abreviado (por extenso em casos de dúvida), o nome do periódico ou obra, usando sempre como exemplo os últimos fascículos da revista (www.pvb.com.br). 2. Na elaboração do texto devem ser atendidas as seguintes normas: a) A digitação deve ser na fonte Cambria, corpo 10, entrelinha simples; a página deve ser no formato A4, com 2cm de margens (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das Figuras no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras e os Quadros devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Os nomes científicos devem ser escritos por extenso no início de cada capítulo. b) a redação dos artigos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números

arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o artigo; as notas deverão ser lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo número de chamada, sem o uso do "Inserir nota de fim", do Word. Todos os Quadros e todas as Figuras têm que ser citados no texto. Estas citações serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, em ordem crescente. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não devem conter citações bibliográficas. c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores (na língua do país dos autores), o e-mail do autor para correspondência e dos demais autores. Em sua redação deve-se usar vírgulas em vez de traços horizontais; d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no artigo, serão colocadas entre parênteses, após o nome da instituição por extenso; e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema "autor e ano"; artigos de até dois autores serão citados pelos nomes dos dois, e com mais de dois, pelo nome do primeiro, seguido de "et al.", mais o ano; se dois artigos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano. Artigos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, "(Resumo)" ou "(Apud Fulano e o ano.)"; a referência do artigo que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de artigos colocados cronologicamente entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano, como por exemplo: (Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007); f) a Lista das REFERÊNCIAS deverá ser apresentada em caixa alta e baixa, com os nomes científicos em itálico (grifo), e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos. 3. Os gráficos (=Figuras) devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área do gráfico (=Figura); evitar-se-á o uso de título ao alto do gráfico (=Figura). 4. As legendas explicativas das Figuras devem conter informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, independente do texto). 5. Os Quadros devem ser explicativos por si mesmos. Entre o título (em negrito) e as colunas deve vir o cabeçalho entre dois traços longos, um acima e outro abaixo. Não há traços verticais, nem fundos cinzas. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com "a" em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.