

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

MARIANA BATISTA ANDRADE

**NEOPLASIAS MAMÁRIAS EM CADELAS: ESTUDO
EPIDEMIOLÓGICO E EXPRESSÃO DE HER-2 EM CARCINOMAS**

DOUTORADO

UBERLÂNDIA

2017

MARIANA BATISTA ANDRADE

**NEOPLASIAS MAMÁRIAS EM CADELAS: ESTUDO
EPIDEMIOLÓGICO E EXPRESSÃO DE HER-2 EM CARCINOMAS**

Tese 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 Doutora em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Saúde Animal

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alessandra Aparecida
Medeiros-Ronchi

UBERLÂNDIA

2017

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

A553n
2017

Andrade, Mariana Batista, 1984-
Neoplasias mamárias em cadelas : Estudo epidemiológico e
expressão de HER-2 em carcinomas / Mariana Batista Andrade. - 2017.
99 f. : il.

Orientador: Alessandra Aparecida Medeiros.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Inclui bibliografia.

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

CDU: 619

NEOPLASIAS MAMÁRIAS EM CADELAS: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E EXPRESSÃO DE HER-2 EM CARCINOMAS

Tese aprovada para obtenção do título de Doutora no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Uberlândia – MG, pela banca examinadora formada por:

Uberlândia, 16 de março de 2017.

Prof^a. Dr^a. Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi, UFU/MG

Orientadora

Prof. Dr. Matias Pablo Juan Szabó, UFU/MG

Prof^a. Dr^a. Aracelle Elisane Alves, UFU/MG

Prof^a. Dr^a. Erika Maria Terra, UNICEP/SP

Prof. Dr. Humberto Eustáquio Coelho, UNIUBE/MG

UBERLÂNDIA

2017

“A compaixão pelos animais está intimamente ligada a bondade de caráter, e quem é cruel com os animais não pode ser um bom homem. ”

Arthur Schopenhauer

Dedico mais essa conquista, dentre tantas outras, aos meus pais, que me ensinaram a importância da dedicação pessoal no processo de evolução interior. E à Deus, que me concedeu a benção de ter uma família maravilhosa!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, à DEUS, pois sem ELE não haveria existência.

Aos meus pais, criadores da pessoa que me tornei e aos quais nunca vou cansar de agradecer por todo amor, dedicação, carinho, preocupação e companheirismo. Obrigada por me ensinar valores fundamentais como humanidade e persistência.

À minha irmã Mayara, que sempre esteve ao meu lado, aconselhando e consolando nos momentos difíceis, comemorando e brindando nos momentos alegres. Tenho certeza de que vivemos a nossa relação de irmãs na pura essência dos valores que regem esse laço familiar. Amo você!

À Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Medicina Veterinária e Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, por me permitirem trilhar um caminho de evolução intelectual e consequentemente crescer como ser humano e profissional.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Alessandra Aparecida Medeiros-Rochi, que me apoiou e me incentivou a chegar até aqui. Sem ela, a finalização desse doutorado não teria sido possível. Vou ser eternamente grata e grande admiradora desta excelente profissional e dedicada docente que é a Prof^a. Alessandra. Obrigada!

A todos os meus amigos (que são muitos, graças a Deus!), colegas e pessoas que de alguma forma convivem comigo e que me desejam prosperidade e felicidade. Agradeço de coração a todos que me apoiaram durante essa jornada e que estão presentes na finalização de mais uma etapa importantíssima da minha vida. Sou muito abençoada por ter todos vocês!

OBRIGADA!!

RESUMO

As neoplasias mamárias em cadelas são afecções de significativa importância em medicina veterinária pela sua alta frequência, além de serem modelo para o estudo do câncer de mama na mulher. Nesse sentido, se faz necessária a realização de estudos continuados acerca da frequência de tumores e suas características clinicopatológicas. Constituem ainda um grupo heterogêneo de tumores quanto aos padrões histológicos e comportamento biológico, o que torna mais complexo e urgente a identificação de fatores de prognóstico e que possibilitem diagnosticar e tratar de forma mais eficaz animais portadores de tumor de mama. Nos últimos anos, tem se intensificado estudos dirigidos à identificação de marcadores moleculares envolvidos nos inúmeros eventos celulares que ocorrem durante a carcinogênese, como crescimento e diferenciação celular, proliferação, invasão e metástase. O receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER-2) é uma glicoproteína de membrana da família tirosina-quinase, codificada por um gene de mesmo nome, diretamente relacionada a mudanças significativas na proliferação celular e sobrevivência das células tumorais. Durante o processo de mutação desse gene ocorre hiperativação da cascata de sinalização intracelular, que resulta em rápido crescimento das células tumorais. Na mulher, a superexpressão de HER-2 está associada a neoplasias mamárias cujos parâmetros morfológicos sugerem malignidade e pior prognóstico, resultando em alta taxa de recidiva e de mortalidade no estágio inicial da doença, além de elevada incidência de metástases. Entretanto, na cadelas, estudos que investigaram o papel do HER-2 nas neoplasias mamárias, com emprego da imunohistoquímica, não são consensuais até então, mantendo obscuro o significado da sobreexpressão de HER-2 nestas neoplasias. Com intuito de auxiliar na determinação de fatores prognósticos fidedignos para os tumores mamários nas cadelas, o presente trabalho teve como objetivos: determinar a prevalência de lesões mamárias diagnosticadas em cadelas no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia entre 2004 e 2014, bem como a relação entre aspectos epidemiológicos (idade e raça) e clinicopatológicos (ulceração, tamanho do tumor e comportamento biológico) na ocorrência dos tumores de mama; e verificar a expressão de HER-2 em carcinomas mamários de cadelas e sua relação com o tipo e grau histológico, idade das cadelas, metástase em linfonodos e à distância, tamanho tumoral e estadiamento clínico.

Palavras-chave: Fatores de prognóstico, imunohistoquímica, fator de crescimento epidérmico tipo 2, frequência, tumores mamários, canino.

ABSTRACT

Mammary tumors in female dogs are important diseases in veterinary medicine due to their high frequency, besides being a model for the study of breast cancer in women. So, it is necessary to continuous studies on the frequency of tumors and their clinicopathological characteristics. They also constitute a heterogeneous group of tumors in correlation with histological patterns and biological behavior, which makes it more complex and urgent to identify prognostic factors and to make it possible to diagnose and treat animals with mammary tumors more effectively. In the last years, there have been intensified the number of studies about the identification of molecular markers involved in the innumerable cellular events that occur during carcinogenesis, such as cell growth and differentiation, proliferation, invasion and metastasis. HER-2 is a membrane glycoprotein of the tyrosine kinase family, encoded by a gene with the same name, directly related to significant changes in cell proliferation and survival of tumor cells. During mutation process of this gene, hyperactivation of intracellular signaling cascade results in a rapid growth of tumor cells. In women, HER-2 overexpression is associated with breast neoplasms whose morphological parameters suggest poor prognosis and malignancy, resulting in a high rate of recurrence and mortality in the early stage of the disease, as well as a high incidence of metastases. However, in the female dog, until now the extensive variability of results obtained from immunohistochemical protocols proposed for molecular classification, keeps the meaning of HER-2 overexpression in these neoplasms obscure. In order to assist determination of the reliable prognostic factors for canine breast neoplasms, the present study: determined the prevalence of breast lesions diagnosed in female dogs in Laboratory of Veterinary Pathology of the Federal University of Uberlândia between 2004 and 2014, as well as the correlation between epidemiological aspects (age and breed) and clinicopathological (ulceration, tumor size and biological behavior) in the occurrence of breast tumors; verified the HER-2 expression in female mammary carcinomas of dogs and their relationship with the type and histological grade, age of patient, metastasis in lymph nodes or distants, tumor size and clinical staging.

Keywords: Prognostic factors, immunohistochemistry, epidermal growth factor type 2, frequency, mammary tumors, canine.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1: Estadiamento do tumor de mama em cadelas através do sistema TMN, proposto por Owen (1980) -----	23
TABELA 2: Estadiamento do tumor de mama em cadelas através do sistema TMN, proposto por Rutteman, Withrow e MacEwen (2001). Fonte: Sakamoto (2011) -----	24
TABELA 3: Graduação histológica para tumores de mama em mulheres, adaptado por Elston e Ellis (1991) -----	28

CAPÍTULO 2

QUADRO 1: Frequência (N) e Porcentagem (%) de tumores Benignos (B) e Malignos (M) nas 11 principais raças acometidas por tumores mamários em estudo retrospectivo de 728 laudos histopatológicos compreendidos entre 2004-2014 -----	75
TABELA 1: Tipo e tamanho de tumores mamários de cadelas de acordo com a idade, localização e presença ou não de ulceração, a partir de protocolos histopatológicos do Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia – 2004-2014 -----	76
TABELA 2: Tipos histológicos de tumores mamários e lesões não neoplásicas de mama de amostras do acervo de protocolos histopatológicos do Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia – 2004-2014 -----	77

CAPÍTULO 3

TABELA 1: Frequência dos tipos histológicos de carcinomas mamários de cadelas de acordo com grau histológico, Uberlândia-MG, 2016 -----	97
TABELA 2: Características clinicopatológicas de cadelas com neoplasia mamária e relação com os escores de imunomarcação de HER-2, Uberlândia-MG, 2016 -----	98

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

1. Introdução -----	13
2. Revisão de Literatura -----	15
2.1. Aspectos anatômicos e histológicos da glândula mamária -----	15
2.2. Tumores mamários na cadela -----	17
2.2.1. Carcinogênese -----	18
2.3. Fatores de prognóstico e fatores de risco-----	20
2.3.1. Idade, obesidade e predisposição racial -----	20
2.3.2. Comportamento biológico -----	21
2.3.3. Expressão de receptores -----	25
2.3.4. Grau histológico -----	27
2.4. Classificação histológica dos tumores mamários caninos -----	28
2.4.1. Tumores malignos -----	29
2.4.1.1. Carcinoma <i>in situ</i> -----	29
2.4.1.2. Carcinoma complexo -----	30
2.4.1.3. Carcinoma simples -----	31
2.4.1.4. Carcinomas tubular, papilar e túbulo-papilar -----	31
2.4.1.5. Carcinoma sólido e cribriforme -----	32
2.4.1.6. Carcinoma anaplásico -----	33
2.4.1.7. Carcinoma em tumor misto -----	33
2.4.1.8. Tipos especiais de carcinoma -----	34
2.4.1.8.1. Carcinoma de células escamosas -----	34
2.4.1.8.2. Carcinoma de células fusiformes -----	35
2.4.1.8.3. Carcinoma mucinoso -----	35
2.4.1.8.4. Carcinoma rico em lipídeos -----	36
2.4.1.9. Sarcomas -----	36
2.4.1.9.1. Fibrossarcoma -----	37
2.4.1.9.2. Osteossarcoma -----	37
2.4.1.9.3. Carcinosarcoma -----	38

2.4.2. Tumores benignos -----	38
2.4.2.1. Adenoma simples -----	39
2.4.2.2. Adenoma complexo -----	39
2.4.2.3. Adenoma basalóide -----	40
2.4.2.4. Fibroadenoma -----	40
2.4.2.5. Papiloma ductal -----	41
2.4.3. Lesões mamárias não neoplásicas -----	41
2.4.3.1. Hiperplasia ductal -----	42
2.4.3.2. Hiperplasia lobular -----	43
2.4.3.3. Cistos -----	44
2.4.3.4. Ectasia ductal -----	44
2.4.3.5. Fibrose focal ou fibroesclerose -----	44
2.4.3.6. Ginecomastia -----	44
2.5. HER-2: papel na carcinogênese dos tumores de mama em mulheres e na cadela -----	45
Referências -----	49
CAPÍTULO 2 - Estudo Retrospectivo de 947 Lesões Mamárias em Cadelas	59
CAPÍTULO 3 - Fatores de Prognóstico em Carcinomas Mamários Caninos e sua Relação com Expressão de HER-2 -----	80
-	

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

1. Introdução

As neoplasias mamárias em cadelas são afecções de significativa importância em medicina veterinária e têm sido muito investigadas, inclusive por servirem de modelo para o estudo do câncer de mama na mulher (MARTINS, FERREIRA, 2003). Os tumores mamários caninos (TMC) apresentam várias características epidemiológicas, clínicas, biológicas e genéticas semelhantes aos da espécie humana. Apesar da similaridade histológica entre as glândulas mamárias de ambas as espécies, a incidência de neoplasias no referido tecido pode ser até três vezes maior na cadelas (HELLMÉN, 2005). Nos últimos anos, observou-se aumento da ocorrência de tumores mamários em cadelas, em sua maioria malignos, o que reforça a importância clínica e epidemiológica dessa patologia na referida espécie (DENARDI et al., 2002).

O aumento de volume da glândula mamária em cadelas, não relacionado com pseudociese, lactação ou mastite, deve receber atenção especial (ZUCCARI, SANTANA, ROCHA, 2001), considerando-se a alta incidência de neoplasias mamárias na referida espécie (ZUCCARI, SANTANA, ROCHA, 2001, FELICIANO et al., 2012, TORÍBIO et al., 2012) e o fato de que cerca de 50% dos tumores mamários caninos são malignos (GAMA, ALVES, SCHMITT, 2008).

Fatores como tipo e grau histológico, invasão de matriz extracelular, vasos linfáticos e sanguíneos por células tumorais, presença de metástases e estadiamento clínico (TNM) têm sido utilizados como fatores prognósticos na rotina clínica, com intuito de estimar o risco individual em cada paciente e indicam possível evolução clínica desfavorável (DAGLI, 2008). Além disto, fatores ligados ao indivíduo, como idade e raça, tem sido relacionados como fatores de prognóstico. A probabilidade de desenvolvimento de TMC aumenta em cadelas idosas, sendo a idade média de manifestação entre os 10 e 11 anos (LANA, RUTTEMAN, WITHROW, 2007). Quanto à raça, apesar de não existir predisposição racial evidente (FELICIANO et al., 2012), Queiroga e Lopes (2002) observaram que as raças Boxer e Beagle apresentam menor risco de desenvolvimento de tumor de mama, ao passo que as raças de caça parecem apresentar um risco aumentado.

O manejo dos TMC ainda constitui um desafio para os clínicos e patologistas veterinários, principalmente no que tange à variedade de nomenclaturas e classificações utilizadas na determinação do tipo e das características patológicas do tumor, atualmente existentes

(ZUCCARI et al., 2008). Além disso, ainda existem controvérsias acerca dos fatores que influenciam o seu desenvolvimento e determinam seu comportamento biológico (OLIVEIRA et al., 2003), refletindo a importância dos estudos continuados abordando a epidemiologia das neoplasias mamárias em cadelas.

A heterogeneidade em termos de morfologia e comportamento biológico têm intensificado também as pesquisas dirigidas à identificação de marcadores moleculares envolvidos nos inúmeros eventos celulares que ocorrem durante a carcinogênese dos TMC, como crescimento e diferenciação celular, proliferação, invasão e metástase (RAKHA et al., 2009).

Estudos demonstraram que biomarcadores moleculares relevantes e relacionados ao prognóstico do câncer de mama na mulher também estavam presentes em tumores de glândula mamária de cadelas (KLOPFLEISCH et al., 2011). Em função disso, a abordagem aos mecanismos de amplificação e superexpressão de vários marcadores tornou-se expressiva em oncologia veterinária, a exemplo dos genes e produtos proteicos da família tirosina quinase, muito abordados em pesquisas na oncologia humana (RUNGSIPAT et al., 1999).

O receptor HER-2 ou receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2, é uma glicoproteína de membrana da família tirosina-quinase, codificada por um gene de mesmo nome (MARTÍN DE LAS MULAS et al., 2003). Sabe-se que a superexpressão desta oncoproteína está diretamente relacionada a mudanças significativas na proliferação celular e sobrevivência das células tumorais, uma vez que durante o processo de mutação desse gene, ocorre hiperativação da cascata de sinalização intracelular, que resulta em rápido crescimento das células tumorais. Além disso, está relacionado à inibição da apoptose, migração e invasividade celular, e angiogênese tumoral. Dessa maneira, além de ser considerado um marcador prognóstico relacionado à sobrevida global e tempo livre de doença, é também utilizado como fator preditivo da resposta esperada à terapia com drogas como trastuzumab¹ em mulheres com câncer de mama (CIRQUEIRA et al., 2011).

Na mulher, a superexpressão de HER-2 via de regra está associada a neoplasias mamárias cujos parâmetros morfológicos indicam agressividade e pior prognóstico, resultando em alta taxa de recidiva e de mortalidade no estágio inicial da doença, além de elevada incidência de metástases (PEREZ et al., 2014). Ele é utilizado como marcador prognóstico único ou em associação a outras proteínas (p53, Ki67, ER, PR) (RESSEL et al., 2013). A amplificação do gene HER-2 ocorre em aproximadamente 30% dos carcinomas ductais invasivos, com

correlação positiva com outros fatores prognósticos estabelecidos para o câncer de mama (FERREIRA, 2010).

Embora o papel de HER-2 como biomarcador prognóstico e terapêutico esteja bem definido para o câncer de mama humano, sua relevância na patogênese e prognóstico do TMC ainda é controverso. Estudos abordando a superexpressão de HER-2 em tecidos mamários neoplásicos de cadelas são contraditórios e resultam da diversidade de técnicas laboratoriais atualmente disponíveis para detecção do nível de expressão proteica e de amplificação gênica (BURRAI et al., 2015).

A expressão de HER-2 foi apontada como possível fator de prognóstico desfavorável por estar estatisticamente correlacionada a tumores de alto grau histológico no estudo de Dutra et al. (2004), enquanto Hsu et al. (2009) apontaram maior taxa de sobrevivência em cadelas cujos tumores mamários apresentaram superexpressão de HER-2. Já Ressel e colaboradores (2013) não encontraram relação entre o nível de expressão proteica e fatores de prognóstico. Assim, os resultados encontrados na literatura até então são contraditórios, reforçando a necessidade de estudos adicionais abordando a expressão da proteína na espécie canina.

Com intuito de auxiliar na determinação de fatores prognósticos fidedignos para os TMC, o presente trabalho objetivou:

1. Determinar a prevalência de lesões mamárias diagnosticadas em cadelas no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia entre 2004 e 2014, bem como a relação entre aspectos epidemiológicos (idade e raça) e clínicopatológicos (ulceração, tamanho do tumor e comportamento biológico) na ocorrência dos tumores de mama;
2. Quantificar a expressão proteica de HER-2 em carcinomas mamários de cadelas por meio da técnica de imunohistoquímica, e relacionar o nível de expressão ao tipo e grau histológico, idade das cadelas, metástase em linfonodos e à distância, e tamanho tumoral;

2. Revisão de literatura

2.1. Aspectos anatômicos e histológicos da glândula mamária

Na espécie canina, as glândulas mamárias constituem glândulas sudoríparas modificadas de localização subcutânea, que se estendem da região axilar à região inguinal. Via de regra, a cadela possui cinco pares de glândulas mamárias, cujas posições são indicadas pelos mamilos: duas torácicas, duas abdominais e uma inguinal, dispostas em duas cadeias paralelas (EVANS e CHRISTENSEN, 1993; DYCE, SACK, WENSING, 1997; PEREIRA et. al, 2000).

A mama é uma glândula do tipo tubuloalveolar composta, embriologicamente derivada do ectoderma. Desenvolvem-se como botões epiteliais que crescem no mesênquima subjacente a partir de um espessamento linear paralelo denominado crista mamária, que abrange desde a região axilar até a inguinal. No final do desenvolvimento embrionário, as projeções epiteliais canalizam-se formando os ductos lactíferos, enquanto os botões epiteliais originam os ductos pequenos, alvéolos secretores e as células mioepiteliais (BANKS, 1991; EVANS e CHRISTENSEN, 1993; DYCE, SACK, WENSING, 1997).

Os alvéolos, que são as unidades funcionais da glândula mamária, e seus respectivos ductos alveolares se agrupam, formando os lóbulos. Os ductos correspondentes a cada lóbulo drenam em canais excretores de maior calibre, denominados ductos lactíferos, que juntos formam uma dilatação ampolar – o seio lactífero – antes de atingir o mamilo. A junção dos lóbulos forma os lobos, separados uns dos outros por tecido conjuntivo fibroso moderadamente denso (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2008).

O epitélio de revestimento dos alvéolos e ductos alveolares é constituído por dupla camada de células, sendo a camada interna formada por epitélio simples cúbico, e a externa por células mioepiteliais que se contraem sob ação da oxitocina, promovendo a expulsão do leite. As células da camada interna ou secretora sofrem alterações morfológicas correspondentes aos estágios de ação secretora. Em repouso, possuem núcleo oval, citoplasma pouco abundante e homogêneo, e limites pouco definidos. Durante a fase de secreção o citoplasma aumenta em volume e a célula fica maior (DAVIDSON, STABENFELDT, 2007; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2008).

Tanto o suprimento sanguíneo quanto a drenagem linfática comunicam determinados pares de glândulas mamárias. As glândulas torácicas craniais e caudais são irrigadas por ramos das artérias intercostal, torácica interna e torácica lateral; as artérias epigástricas superficiais craniais suprem as mamas torácicas caudais e abdominais craniais, ao passo que as artérias epigástricas superficiais caudais irrigam as glândulas mamárias abdominais caudais

e inguinais (FOSSUM, 2007). As artérias epigástrica profunda cranial, abdominal segmentada, labial e ilíaca circunflexa profunda também participam da irrigação mamária (DYCE, SACK, WENSING, 1997).

Os três pares craniais de glândulas mamárias são em grande parte drenados pelos linfonodos axilares, enquanto o inguinal superficial é responsável pela drenagem dos dois pares caudais, verificando-se comunicação linfática entre glândulas mamárias homolaterais (FOSSUM, 2007). Segundo Patsikas e Dessiris (1996) e Pereira et al. (2003), o linfonodo inguinal superficial também participa da drenagem do terceiro par de glândulas mamárias (abdominais craniais). De acordo com os achados de Pereira et al. (2003), pode ocorrer participação simultânea dos linfonodos inguinal superficial e poplíteo na drenagem linfática das glândulas mamárias inguinais.

No entanto, a circulação linfática pode alterar-se ao longo do desenvolvimento de um processo neoplásico, inclusive promovendo comunicação entre as cadeias direita e esquerda. Tal fato implica na possibilidade de disseminação do tumor independentemente do fluxo normal da corrente linfática (PATSIKAS et al., 2006). Wilson e Hayes (1980) afirmam que a drenagem linfática de glândulas mamárias neoplásicas em cadelas pode ser consideravelmente mais ampla, envolvendo linfonodos cervicais, poplíteos, esternais e ilíacos mediais. Segundo Pereira et al. (2003) essa amplificação da rede linfática se dá em decorrência da habilidade das células neoplásicas em secretarem fatores linfoangiogênicos, que aumentam a rede vascular linfática e suas anastomoses, agindo a favor da disseminação neoplásica. Em mulheres, Bourgeois e Frühling (1999) identificaram metástases de neoplasias de glândulas mamárias em linfonodos mamários contralaterais e homolaterais simultaneamente em 1/3 das 153 pacientes.

2.2. Tumores mamários na cadelas

Os TMC representam a segunda neoplasia mais frequente na espécie canina, sendo ultrapassados apenas pelos tumores de pele (MORRIS, DOBSON, 2001). Segundo Lana, Rutteman, Withrow (2007) são os tumores que ocorrem com maior frequência em cadelas, variando de 41 a 53% do total de tumores malignos em geral. Em estudo retrospectivo realizado na Universidade Federal de Santa Maria, entre 1965 e 2004, 7,8% dos cães vieram à óbito em decorrência de neoplasias, e destes, 25,4% correspondiam a neoplasias malignas de mama (FIGHERA et al., 2008). Oliveira Filho et al. (2010) relataram prevalência de tumores

mamários em cadela variando entre 36,3% e 49,2%, referentes a exames histopatológicos realizados ao longo de cinco anos (2004-2008) na Universidade Federal de Santa Maria. Esses autores registraram a seguinte prevalência da enfermidade, a cada ano: 36,3% em 2004, 39,2% em 2005, 43,4% em 2006, 39,6% em 2007 e 49,2% em 2008.

Em geral, as mamas abdominais caudais e inguinais são as mais afetadas pelas neoplasias, por apresentarem maior volume tecidual (e consequente estímulo hormonal) e estarem mais sujeitas a traumatismos (DALECK et al., 1998). Segundo Benjamin, Lee e Saunders (1999), 60% das cadelas apresentam acometimento simultâneo de mais de uma glândula mamária, sendo comum a ocorrência de tipos histológicos distintos.

2.2.1. Carcinogênese

Como os genes controlam a hereditariedade e as atividades celulares do dia-a-dia, o câncer geralmente é causado por mutação ou ativação anormal dos genes que controlam o crescimento celular (LOURO, 2000), resultando em modificações progressivas da biologia celular caracterizadas por alterações na proliferação, diferenciação e na interação das células com o meio extracelular (COTRAN, KUMAR, ROBBINS, 2000).

Segundo Misdorp (2002), a proliferação celular resultante do estímulo hormonal independe da existência de agente iniciador específico, como ocorre nos processos induzidos por vírus ou agentes químicos. Para o autor, o referido processo precede as mutações genéticas que darão origem à célula neoplásica. Entretanto, para Carreño, Peixoto, Giglio (1999), os hormônios estão envolvidos apenas na proliferação das células já transformadas por outros carcinógenos.

Os hormônios (tanto endógenos quanto exógenos) têm o poder de estimular a proliferação celular, levando a alterações genéticas e consequente carcinogênese (HENDERSON, FEIGELSON, 2000). Isso ocorre já que a atividade normal da célula depende da perfeita integração entre as várias vias metabólicas, e grande parte desse metabolismo é controlado pelos hormônios. O descontrole da secreção hormonal resulta, portanto, em perda da homeostasia celular, provocando várias alterações, dentre elas o câncer (GUYTON, 1991).

As neoplasias hormônio-dependentes, dentre as quais destaca-se a de mama, útero (endométrio e musculatura lisa), ovário, testículo, próstata, tireóide e o osteossarcoma,

compartilham do mesmo mecanismo de carcinogênese, sob ação de hormônios específicos. Acredita-se que os oncogenes, genes supressores tumorais e os genes do reparo do DNA estejam envolvidos nesse processo (HENDERSON, FEIGELSON, 2000).

Os TMC ocorrem quase que exclusivamente nas fêmeas, mas cães machos com hiperestrogenismo decorrente do sertolioma também podem apresentá-los (MISDORP, 2002). O estrógeno, a prolactina (DENG & BRODIE, 2001), a progesterona (VORHERR, 1987 apud SILVA, SERAKIDES, CASSALI, 2004), os andrógenos (KODAMA & KODAMA, 1970 apud SILVA, SERAKIDES, CASSALI, 2004) e até os hormônios tireoidianos estão envolvidos na carcinogênese mamária (NOGUEIRA & BRENTANI, 1996 apud SILVA, SERAKIDES, CASSALI, 2004). A progesterona exógena estimula a síntese de hormônio do crescimento na glândula mamária, que promove proliferação túbulo-alveolar e consequente hiperplasia de elementos mioepiteliais e secretórios, induzindo a formação de nódulos benignos em animais jovens (RUTTEMAN, WITHROW, MACEWEN, 2001; MISDORP, 2002). Já o estrógeno estimula o desenvolvimento ductal, e segundo os autores supracitados é comum o desenvolvimento de neoplasias malignas em cadelas após administração contínua e em altas doses de ambos os hormônios associados.

Receptores de estrógeno (ER), progesterona (PR), andrógenos, prolactina e fator de crescimento epidermal já foram demonstrados nos tumores de mama em cadelas, incluindo a coexistência desses receptores em uma mesma neoplasia (MEUTEN, 2002). ER e PR têm sido identificados tanto em tecido mamário normal como em neoplasias benignas e em carcinomas de cadelas. Acredita-se que exista uma relação entre o número destes receptores e capacidade proliferativa das células neoplásicas (COSTA et al., 2002). Estudos verificaram uma correlação entre o baixo número de ER e PR no tecido neoplásico e pior prognóstico clínico, o que significa maior expressão destes receptores em maior proporção de neoplasias benignas, quando comparadas às neoplasias malignas (CASSALI, 2000; GERALDES, GÄRTNER, SCHMITT, 2000; CHANG et al., 2009). Segundo Geraldes, Gärtner, Schmitt (2000), a progressão da neoplasia e o aumento da malignidade são acompanhadas de redução da dependência hormonal e maior autonomia das células neoplásicas. Entretanto, Millanta et al. (2005) não encontraram correlação entre menor expressão de receptores de estrógeno e progesterona e pior prognóstico. Para Sartin e colaboradores (1992), a diminuição da relação ER/PR em carcinomas mamários que originalmente continham esses receptores, pode ser associada à diminuição da diferenciação celular e progressão da doença.

2.3. Fatores de prognóstico e fatores de risco

A apresentação, o comportamento clínico, a morfologia e as características biológicas da neoplasia mamária nas espécies humana e canina são extremamente variadas, sendo que um dos maiores desafios enfrentados pelos clínicos que tratam pacientes com câncer de mama é estimar o prognóstico e predizer o curso clínico da doença para que o melhor regime de tratamento seja instituído (HICKS, KULKARNI, 2008; RAKHA, ELLIS, 2009).

Em linhas gerais, consideram-se como fatores de prognóstico para tumores de mama em cadelas: status reprodutivo do animal (fêmea intacta ou castrada), características intrínsecas à neoplasia (tamanho e estágio do tumor, comportamento tumoral, tipo histopatológico, grau do tumor, presença de ulceração e envolvimento de linfonodos) e alterações genéticas moleculares (SORENMO, 2003; ZUCARI et al., 2008).

2.3.1. Idade, obesidade e predisposição racial

A idade é considerada um dos mais importantes fatores de risco para desenvolvimento da neoplasia mamária em cadelas (SORENMO et al., 2011). Maior incidência é observada em cadelas de meia idade e idosas, compreendendo a faixa etária de 8 a 10 anos (STRATMANN et al., 2008; SORENMO et al., 2009). Segundo Lana, Rutteman, Withrow (2007) a média de idade em que a doença neoplásica se manifesta encontra-se entre os 10 e 11 anos, sendo que a probabilidade de desenvolvimento aumenta com o avançar da idade. Salas et al. (2015) enfatizam a ampla faixa etária passível de ocorrência de TMC, considerando que algumas raças, como o Springer Spaniel, podem desenvolver a patologia em idade relativamente precoce (média de 6,9 anos). No estudo de Sorenmo et al. (2009) a média de idade para o aparecimento de tumores benignos foi de 8,5 anos, e para tumores malignos de 9,5 anos. De acordo com Perez Alenza et al. (1998) é raro o aparecimento de neoplasias malignas antes de cinco anos de idade.

Tanto a obesidade como a alimentação caseira (rica em proteína oriunda de carnes bovina e suína) já foram apontados pela literatura como possíveis fatores promotores da carcinogênese em cães (SAKAMOTO, 2011). Segundo Queiroga e Lopes (2002), cadelas obesas entre os nove e 11 meses de idade, têm maior risco de desenvolvimento de tumores de mama na idade adulta que cadelas não obesas. Sonnenschein e colaboradores (1991)

observaram redução do risco em cadelas castradas e que eram magras entre os nove e 12 meses de vida, e ausência de influência em cães que já se apresentavam com sobre peso um ano antes de desenvolverem neoplasia mamária ou foram alimentados com dietas ricas em gordura neste período. Perez Alenza et al. (1998) consideram obesidade a um ano de idade e dieta rica em carne vermelha como fatores predisponentes independentes.

Em mulheres obesas, o aumento do fator de risco está associado à elevação na concentração sérica de estrógeno proveniente da biotransformação da androstenediona, que ocorre no tecido adiposo (SILVA, SERAKIDES, CASSALI, 2004). O sobre peso também resulta em hiperinsulinemia e aumento da produção local de estrógeno por aromatases, que estão diretamente relacionados ao desenvolvimento do câncer de mama (CLEARY, GROSSMANN, RAY, 2010). Segundo Sleeckx et al. (2011) tais fatores provavelmente exercem influência semelhante na carcinogênese mamária canina. Estudos têm apontado a influência dos níveis séricos de lipídios e lipoproteínas nesse segmento da patogênese do câncer de mama em mulheres, entretanto essa correlação não foi estabelecida em cadelas (SORENMO, 2003).

A existência de predisposição racial para o desenvolvimento da doença ainda é controversa, considerando-se os dados divergentes encontrados na literatura. De acordo com Daleck et al. (1998) e Feliciano et al. (2012) a raça não pode ser considerada um fator de risco fidedigno. Para Sorenmo (2003), as raças mais acometidas podem variar de acordo com os estudos e a população canina em função da localização geográfica. Entretanto, apontam os Poodles, Cocker spaniels, Pastores Alemães, Maltês, Yorkshire Terriers e Daschshund como algumas das raças mais prevalentes, achados confirmados posteriormente por Oliveira Filho et al. (2010). No estudo de Salas et al. (2015) as raças Poodle e Cocker foram as prevalentes, representando 33,3% das raças acometidas. Shafiee e colaboradores (2013) encontraram predominância de Pastor Alemão, Daschshund e raças cruzadas com terriers. Segundo Sorenmo et al. (2011) o desenvolvimento neoplásico em função da raça é orientado por um componente genético, teoria esta reforçada por estudos que demonstram que algumas linhagens ou famílias dentro de raças específicas possuem maior risco de desenvolvimento que outras.

2.3.2. Comportamento biológico

Lesões inicialmente benignas podem se tornar malignas e originar neoplasias de igual tipo histológico, sugerindo que à medida que se desenvolvem, os tumores mamários caninos evoluem para malignidade (SORENMO et al., 2009).

As neoplasias de mama podem evoluir histologicamente para tecidos menos diferenciados, ou seja, mais agressivos, levando à possibilidade de metástase para glândulas mamárias adjacentes e outros órgãos (BENJAMIN, LEE, SAUNDERS, 1999; SORENMO et al., 2009). Em torno de 25 a 50% dos TMC malignos se disseminam através de vasos sanguíneos e linfáticos, principalmente para os linfonodos regionais e pulmões (HEDLUND, 2002). Segundo O'keefe (1997) estudos revelam uma porcentagem de recidiva de 70% em animais com tumores maiores que 3 cm de diâmetro e maior grau de anaplasia, e 30% nas cadelas que possuem tumores menores e mais diferenciados, ao longo de um ano de avaliação.

O sistema TNM (Tumor/Linfonodo/Metástase) é uma classificação originalmente proposta pela OMS, para tumores de mama em mulheres (OWEN, 1980), que foi posteriormente reformulada por Rutteman, Withrow e MacEwen (2001). De acordo com Nunes (2007), é considerado um fator prognóstico validado pelo Colégio Americano de Patologistas, e permite determinar o estadiamento do tumor, bem como acompanhar seu comportamento biológico (progressão, regressão ou estacionamento) (SAKAMOTO, 2011).

É norteado por três elementos de avaliação onde “T” indica a extensão (em tamanho) do tumor primário, “N” o envolvimento de linfonodos regionais e “M” a presença/ausência de metástases à distância (SAKAMOTO, 2011). De acordo com a classificação original da OMS, o parâmetro “T” é subdividido em três categorias que associam o tamanho do tumor à evidências clínicas de fixação dos mesmos ao tecidos subjacentes (pele e musculatura). Já o parâmetro “N” possui subclassificações que indicam o envolvimento de linfonodos regionais (axilares e inguinais) ipsilaterais ou envolvimento bilateral dos mesmos, e cada uma delas ainda é subdividida no intuito de identificar se os mesmos estão “livres” ou aderidos aos tecidos subjacentes (TABELA 1).

TABELA 1: Estadiamento do tumor de mama em cadeia através do sistema TNM, proposto por Owen (1980)**T: diâmetro máximo do tumor****T₀: sem evidência de tumor****T₁: diâmetro máximo < 3cm****T_{1a}: tumor não fixo****T_{1b}: tumor fixado à pele****T_{1c}: tumor fixado à musculatura****T₂: diâmetro máximo de 3 - 5 cm****T_{2a}: tumor não fixo****T_{2b}: tumor fixado à pele****T_{2c}: tumor fixado à musculatura****T₃: > 5cm de diâmetro****T_{3a}: tumor não fixo****T_{3b}: tumor fixado à pele****T_{3c}: tumor fixado à musculatura****T₄: tumor de qualquer tamanho, carcinoma inflamatório****N: envolvimento de linfonodos regionais (axilar e/ou inguinal)****N₀: sem evidência de envolvimento de linfonodos****N₁: envolvimento de linfonodos ipsilaterais****N_{1a}: linfonodos envolvidos não-fixados****N_{1b}: linfonodos envolvidos fixados****N₂: envolvimento bilateral de linfonodos****N_{2a}: linfonodos envolvidos não-fixados****N_{2b}: linfonodos envolvidos fixados****M: presença de metástases à distância****M₀: ausência de metástases****M₁: presença de metástases à distância**

ESTÁGIO	T	N	M
I	T _{1a} , b ou c	N ₀ ou N _{1a} (-) ou N _{2a} (-)	M ₀
II	T ₀	N ₁ (+)	M ₀
	T ₁ , b ou c	N ₁ (+)	
	T ₂ , b ou c	N ₀ (+) ou N _{1a} (+)	
III	Qualquer T ₃	Qualquer N	M ₀
	Qualquer T	Qualquer N _b	
IV	Qualquer T	Qualquer N	M ₁

(-) = histologicamente negativo

(+) = histologicamente positivo

Em 2001, Rutteman, Withrow e MacEwen propuseram uma reformulação do sistema de classificação, originando uma versão mais simplificada que não contempla a fixação do tumor e linfonodos aos tecidos subjacentes (pele e musculatura), durante a avaliação clínica para estadiamento do tumor. Além disso a categoria “N” não subdivide o envolvimento dos linfonodos em “ipsilateral” e “bilateral” (TABELA 2).

TABELA 2: Estadiamento do tumor de mama em cadelas através do sistema TMN, proposto por Rutteman, Withrow e MacEwen (2001).

T: diâmetro máximo do tumor			
T₁: diâmetro máximo < 3cm			
T₂: diâmetro máximo de 3 - 5 cm			
T₃: > 5cm de diâmetro			
N: envolvimento de linfonodos regionais			
N₀: ausência de metástases (cito ou histopatológico)			
N₁: presença de metástases (cito ou histopatológico)			
M: presença de metástases à distância			
M₀: ausência de metástases			
M₁: presença de metástases à distância			
ESTÁGIO	T	N	M
I	T ₁	N ₀	M ₀
II	T ₂	N ₀	M ₀
III	T ₃	N ₀	M ₀
IV	Qualquer	N ₁	M ₀
V	Qualquer	Qualquer	M ₁

Em mulheres, esse sistema ainda é amplamente utilizado como fator preditivo no acompanhamento clínico de carcinomas mamários (ORUCEVIC et al., 2015) e, em cadelas, vêm sendo associado a outros fatores de prognóstico, como grau e tipo histológico (CEROVŠEK et al., 2013; PEÑA et al., 2013; GUNDIM et al., 2016) e à taxa de sobrevida global (SANTOS et al., 2013). Gundim et al. (2016), observou que a maior parte dos carcinomas simples, tipo histológico considerado agressivo, foram classificados em estágio I pelo sistema TNM. Entretanto não houve diferença significativa quanto à frequência das cadelas com esse tipo histológico de tumor, entre os diferentes estágios.

Sakamoto (2011) encontrou correlação positiva entre o sistema TNM e o tipo histológico das neoplasias de mama em cadelas, concluindo que quanto pior o tipo histológico da neoplasia, mais avançado era o estágio clínico do animal de acordo com a classificação TNM ($p=0,0034$), considerando-se o estadiamento clínico dentro de cada tipo histológico. Por exemplo, 83,3% (5/6) dos carcinomas sólidos se enquadravam no estágio IV.

2.3.3. Expressão de receptores

Sabe-se que a diversidade de fatores acerca da biologia tumoral muitas vezes dificulta o diagnóstico mais acurado, bem a como a determinação de prognóstico fidedigno e a instituição do tratamento mais adequado. Tais casos exigem abrangência mais específica das características celulares e moleculares dos neoplasmas, que vão além da definição de malignidade (CASSALI et al., 2014). A identificação de receptores celulares e moléculas relacionadas à progressão tumoral permite caracterizar o imunofenótipo das células neoplásicas, que pode constituir um importante fator prognóstico (HORTA et al., 2012).

Dentre os marcadores moleculares utilizados na oncologia humana, p53, Ki-67 e HER-2 são alguns dos considerados fatores prognósticos independentes na rotina pós-cirúrgica de mulheres com câncer de mama (ZUCCARI et al., 2008). Em medicina veterinária, apesar da análise imunohistoquímica ainda não ser rotina, as possibilidades para utilização desta técnica são ilimitadas (HORTA et al., 2012). Ainda segundo esses autores, a avaliação da proliferação celular, angiogênese, expressão de COX-2 e outros marcadores celulares representam fatores prognósticos e preditivos para inúmeros processos neoplásicos.

Lee et al. (2004) consideraram a superexpressão da proteína p53 como útil na predição do aumento do potencial maligno, associando-o a pior prognóstico em cadelas com tumores mamários malignos. De acordo com este estudo, a maior expressão de p53 se mostrou um fator de risco independente relacionado ao aumento da recorrência, mortalidade e redução do tempo de sobrevida.

Acredita-se que a mutação deste gene seja a alteração genética mais comum entre os tumores mamários caninos e que esteja diretamente associada à progressão tumoral (VAN LEEUWEN et al., 1996; VELDHOEN et al., 1999). Essa alteração resulta na produção de uma proteína p53 defeituosa, não funcional e de eliminação lenta, o que leva ao seu acúmulo no interior da célula e permite a detecção da mesma, através da imunohistoquímica (SOUZA, 2006). Em mulheres, o prognóstico parece ser ainda pior quando existe superexpressão concomitante das proteínas p53 e HER-2. Postula-se que nesses casos, ocorre a perda do mecanismo chave de controle da proliferação celular, resultando em um ativador de potencial maligno e consequente fenótipo agressivo (ZUCCARI et al., 2008).

A detecção de marcadores da angiogênese tumoral se faz útil, uma vez que a formação de novos vasos sanguíneos é essencial para o crescimento, manutenção e disseminação dos neoplasmas (HORTA et al., 2012). Os principais fatores pró-angiogênicos são o VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), aFGF e bFGF (fatores de crescimento fibroblásticos ácido e básico respectivamente), prostaglandina E2 e Interleucina-8 (CHUN, THAMM, 2007). O papel de VEGF como marcador de malignidade e indicador de prognóstico já foi documentado em tumores mamários caninos e felinos (MILLANTA et al., 2006).

Em geral, os tumores mamários caninos apresentam superexpressão de COX-2, que é particularmente mais intensa em tipos histológicos malignos e menos diferenciados (HELLER et al., 2005). Millanta e colaboradores (2006) detectaram expressão desta enzima em 100% e 96% dos carcinomas mamários caninos e felinos, respectivamente. Queiroga e colaboradores (2005) observaram níveis de expressão consideravelmente aumentados em tumores que exibiam características clínicas típicas de malignidade, como grandes dimensões, ulceração de pele, aderência aos tecidos subjacentes e baixa diferenciação histológica. Sugerem ainda que a referida enzima possa exercer papel especial no desenvolvimento dos carcinomas inflamatórios, através da degradação da matriz extracelular e potencialização da angiogênese. O padrão de marcação se faz importante em termos de prognóstico, considerando que a marcação de membrana está majoritariamente associada à tecidos não neoplásicos ou tumores

bem diferenciados, ao passo que a marcação citoplasmática é característica de tumores mais indiferenciados (MARQUES, 2013).

De acordo com os achados de Millanta et al. (2006), o aumento da expressão desta enzima concomitantemente à superexpressão de HER-2 em tumores pobremente diferenciados, esteve correlacionado a um pior prognóstico. Nesse sentido, a ativação de oncogenes como HER-2, pode estar associada à indução da expressão de COX-2. Ainda neste estudo, a expressão elevada de COX2 foi estatisticamente associada à perda de expressão dos receptores de estrogênio (ER) e aumento da expressão dos receptores de progesterona (PR), reforçando que a enzima está superexpressa em tumores de fenótipo agressivo.

O proto-oncogene *HER-2* tem sido mundialmente estudado no contexto das neoplasias mamárias. Sua positividade imuno-histoquímica é considerada marcador prognóstico desfavorável em mulheres com câncer de mama, por estar relacionado à diminuição do tempo de remissão da doença e redução da sobrevida das pacientes em até 50%, quando comparado aos casos HER-2 negativos (ZUCCARI et al., 2008). Em função da sua relevância na oncologia humana, investigações têm sido centradas na expressão proteica de HER-2 como uma via de sinalização na promoção do crescimento do tumor mamário canino (KLOPFLEISCH et al., 2011).

Vários estudos vêm sendo realizados no intuito de identificar uma relevância prognóstica semelhante para a expressão de HER-2 nos tumores mamários caninos (KLOPFLEISCH et al., 2011). De acordo com Horta et al. (2012) essa proteína provavelmente está associada ao desenvolvimento e progressão tumoral de carcinomas mamários em cadelas, porém os resultados encontrados na literatura ainda são controversos. Por exemplo, Gama, Alves, Schmitt (2008) associaram a perda da expressão de HER-2 a mau prognóstico, quando ocorreu concomitantemente à ausência de expressão do receptor de estrogênio e superexpressão de algum dos marcadores de células basais (P-caderina, p63 ou citoqueratina-5).

2.3.4. Grau histológico

A graduação histológica originalmente proposta por Nottingham/Tenovus, e posteriormente modificada por Elston e Ellis, em 1984, é considerada um fator prognóstico independente para o câncer de mama humano (ELSTON e ELLIS, 1991). É um método

subjetivo de avaliação do grau de diferenciação tumoral, baseado em suas características morfológicas, através dos parâmetros: formação tubular, pleomorfismo nuclear e número de mitoses. A maioria dos sistemas de classificação dos carcinomas mamários caninos consistem em modificações deste método (SHAFIEE et al., 2013).

Observa-se diminuição no grau de diferenciação do tumor proporcionalmente à baixa formação tubular, alto grau de pleomorfismo nuclear (núcleos desuniformes em tamanho e forma) e aumento do número de figuras mitóticas (TABELA 3) (ELSTON e ELLIS, 1991).

Quanto maior a pontuação total para a amostra tecidual, mais indiferenciada é a neoplasia mamária, sendo que tumores graduados entre 3 e 5 pontos são considerados bem diferenciados; entre 6 e 7 pontos são moderadamente indiferenciados e entre 8 a 9 pontos, pobemente diferenciados (ELSTON e ELLIS, 1991).

Shafiee et al. (2013) demonstraram que o método é confiável para graduação histológica do tumor mamário canino e encontraram correlação positiva com a classificação histopatológica, principalmente nos casos de carcinoma simples. Carcinomas com prognóstico relativamente favorável, como os complexos, geralmente eram de grau II ou III, ao passo que os simples quase sempre eram classificados como grau III.

TABELA 3: Graduação histológica para tumores de mama em mulheres, adaptado por Elston e Ellis (1991).

Elemento avaliado	Pontuação
Formação tubular	
Em mais de 75% da área tumoral	1
Entre 10 e 75% da área tumoral	2
Em menos de 10% da área tumoral	3
Pleomorfismo nuclear	
Núcleos pequenos, em células uniformes	1
Aumento moderado no tamanho, variabilidade	2
Variabilidade marcada	3
Figuras de mitose	
Número de mitoses avaliados em 10 campos de microscopia	1 – 3

2.4. Classificação histológica dos tumores mamários caninos

O exame histopatológico é considerado o método de diagnóstico definitivo para TMC. Além de caracterizar microscopicamente o tumor, permite ao patologista avaliar se existe infiltração de células neoplásicas na pele e demais tecidos moles adjacentes à lesão (como vasos sanguíneos e linfáticos), obter detalhes histomorfológicos como presença/ausência de pleomorfismo e grau de diferenciação celular, índice mitótico e presença/ausência de necrose

(MISDORP et al., 1999). Desta maneira, as características histopatológicas da lesão também revelam diferentes tipos de comportamento biológico, incluindo o tipo histológico como um dos fatores prognósticos (ZUCCARI et al., 2008).

Entretanto, em função de sua complexidade histogenética, principalmente em termos de heterogeneidade morfológica e comportamento biológico, a classificação histológica dos tumores mamários caninos em cadela ainda representa um campo científico controverso (GAMA, ALVES, SCHMITT 2008). Existem diferentes propostas de classificação histológica para os tumores mamários caninos, incluindo Hampe e Misdorp (1974), Moulton (1990), Benjamin, Lee, Saunders (1999), Misdorp et al. (1999), Goldschmidt et al. (2011), Cassali et al. (2011) (CINTRA et al., 2014). Neste compilado serão abordados Misdorp et al. (1999), Goldschmidt et al. (2011) e Cassali et al. (2014).

2.4.1. Tumores malignos

2.4.1.1. Carcinoma *in situ*

Também denominado carcinoma não invasivo, apresenta-se em forma de um ou mais nódulos bem delimitados, cujas células tumorais não se infiltram através da membrana basal subepitelial, não envolvendo o tecido mamário adjacente. Frequentemente crescem em túbulos ou lóbulos pré-existentes, em cistos ou ductos dilatados (MISDORP et al., 1999). Segundo os referidos autores, como a diferenciação entre um carcinoma *in situ* e uma hiperplasia lobular com severa atipia ou epiteliose atípica pode ser muito difícil, somente as lesões que apresentam características citológicas ou histológicas semelhantes aos seus homólogos invasivos devem ser classificadas como câncer *in situ*. Segundo Cassali et al. (2014) existe uma correlação direta entre a presença de carcinoma *in situ* ductal, de lesões de células colunares atípicas e carcinoma mamário invasivo em cães.

As células tumorais podem ser arranjar em: padrão cribiforme (mais diferenciado), padrão sólido (com ou sem necrose central) e um padrão menos diferenciado, onde as células encontram-se “espalhadas” sobre a membrana basal, revestindo-a (MISDORP et al., 1999; MISDORP et al., 2002).

O formato celular pode ser poligonal, arredondado ou cuboide e a proporção núcleo: citoplasma geralmente é alta, já que muitas vezes as células possuem uma quantidade

escassa de citoplasma eosinofílico. Os núcleos podem ser hiperchromáticos, centralizados, de formato arredondado e oval com cromatina condensada e um único nucléolo central basofílico, existindo moderada taxa de anisocariose e índice mitótico variável (GOLDSCHMIDT et al., 2011).

2.4.1.2.Carcinoma complexo

O carcinoma complexo é um tipo de tumor relativamente comum na cadera, usualmente caracterizado por crescimento expansivo e lobulado, e rara invasão linfática (MISDORP et al., 1999; MISDORP, 2002). Possui componente epitelial maligno e um componente mioepitelial benigno, ambos suportados por um estroma fibrovascular (GOLDSCHMIDT et al., 2011). Segundo Misdorp et al. (1999), a primeira população celular pode apresentar padrão tubulopapilar ou sólido, podendo ocorrer metaplasia escamosa de uma das regiões. Goldschmidt et al. (2011) descreve a disposição das células epiteliais neoplásicas em túbulos irregulares revestidos por uma ou mais camadas de células cuboidais ou colunares, de citoplasma eosinofílico moderado a escasso. Pode-se encontrar moderada ou exacerbada quantidade de anisocariose e anisocitose, variada taxa de mitose e padrão focal ou multifocal de necrose das células epiteliais.

As células mioepiteliais geralmente apresentam formato fusiforme, e estão arranjadas em padrão reticular ou estrelado (MISDORP et al., 1999), dentro de um interstício disposto em feixes e formado por matriz basofílica fibrilar. Possuem a borda celular pobramente delimitada, citoplasma escasso a moderado, levemente eosinofílico e núcleo central de formato ovóide a circular e nucléolo central. Índices de anisocariose e anisocitose são mínimos (GOLDSCHMIDT et al., 2011).

O diagnóstico diferencial entre carcinoma complexo altamente diferenciado e adenoma complexo normalmente é difícil, sendo baseado em indicativos de malignidade como ausência de cápsula, alta celularidade, crescimento infiltrativo, focos de necrose, alto índice mitótico e pleomorfismo do componente epitelial (MISDORP et al., 1999; GOLDSCHMIDT et al., 2011). Pode-se encontrar, ocasionalmente, uma substância mixóide intercelular nesses tumores, que deve ser diferenciada de tecido cartilaginoso jovem existente em carcinossarcomas (MISDORP, 2002).

2.4.1.3.Carcinoma simples

O carcinoma simples é formado por um único tipo de população celular, semelhante às células epiteliais luminais ou às células mioepiteliais do tecido mamário (GOLDSCHMIDT et al., 2011). Possuem probabilidade superior a 50% de infiltração nos tecidos adjacentes e alta tendência a se propagar pelas vias linfática e hematógena. A quantidade de estroma é variável e pode estar associado à necrose ou não (MISDORP et al., 1999).

Fatores como arquitetura de crescimento das células neoplásicas, grau de diferenciação e comportamento biológico do carcinoma simples, permitem classificá-lo em: carcinoma tubular, carcinoma túbulo-papilar, carcinoma cístico-papilar, carcinoma sólido, comedocarcinoma, carcinoma cribiforme e carcinoma anaplásico (GOLDSCHMIDT et al., 2011). A classificação de Misdorp et al. (1999) contempla três tipos de carcinoma simples, cuja sequência em termos de aumento da malignidade é: carcinoma tubulopapilar - carcinoma sólido - carcinoma anaplásico.

2.4.1.4.Carcinomas tubular, papilar e túbulo-papilar

No carcinoma mamário tubular, de ocorrência comum na cadelas, as células neoplásicas possuem morfologia variada e estão arranjadas em padrão tubular. Geralmente o citoplasma é eosinofílico e as margens celulares relativamente distintas, com atividade mitótica variada. O comportamento infiltrativo da neoplasia em conjunto com anisocarose e aumento da atividade mitótica, são fatores auxiliares no diagnóstico diferencial mediante suspeita de adenomas, carcinoma *in situ* e carcinomas, uma vez que são indicativos de malignidade (GOLDSCHMIDT et al., 2011; CASSALI et al., 2014).

Quando as células tumorais se projetam para o interior do lúmen tubular em forma de papilas sésseis ou pedunculadas, tem-se o carcinoma tubulopapilar. Tais papilas são sustentadas por uma fina camada de estroma fibrovascular conectivo (GOLDSCHMIDT et al., 2011). Segundo Misdorp et al. (1999), carcinoma tubulopapilar é uma categoria subdividida em carcinoma tubular – que só possuem túbulos, sem os elementos papilares; e carcinoma papilar – que não possuem os elementos tubulares. Ainda segundo os referidos autores, o subtipo papilar ocorre com frequência no cão e possui estroma escasso. Segundo o mesmo

raciocínio de classificação, Cassali et al. (2014) adaptaram um sistema anteriormente proposto por Seixas et al. (2007), onde carcinomas que possuem formação tubular em mais de 60% de sua estrutura são considerados “tubulares” e aqueles que possuem mais de 60% da área neoplásica constituída por papilas são denominados “papilares”.

Cassali et al. (2014) descreve variações na apresentação do carcinoma papilar, em função da existência de variantes malignas. A existência de células mioepiteliais entre as células epiteliais da projeção papilar e a membrana basal, caracterizam envolvimento de componentes epiteliais e mesenquimais. Lesões papilares benignas podem estar associadas a áreas carcinomatosas *in situ*, onde as células epiteliais se proliferam de maneira uniforme, em padrões de crescimento sólido ou cribiforme. Com relação à existência/integridade da membrana basal, existem os carcinomas papilares não-invasivos ou encapsulados, que normalmente são tumores solitários, formados por células bem diferenciadas, com baixo a moderado grau histológico e nos quais a membrana celular basal está preservada. Já nos carcinomas invasivos, ocorrem áreas de invasão estromal através da membrana, sem morfologia papilar.

Quando a projeção de células neoplásicas em forma papilar ocorre no interior de lúmens ductais dilatados ou císticos, têm-se o carcinoma cístico-papilar (GOLDSCHMIDT et al., 2011; CASSALI et al., 2014) que são tumores bem demarcados, com papilas revestidas por fina camada de tecido conectivo estromal e semelhantes a lesões benignas como hiperplasia ductal papilomatosa, sendo difícil sua distinção histopatológica. Entretanto, metástases inesperadas oriundas deste tipo de carcinoma para linfonodos regionais têm sido relatadas em cães (MISDORP et al., 1999; MISDORP 2002).

2.4.1.5.Carcinoma sólido e cribiforme

O carcinoma sólido é um tipo de carcinoma no qual as células estão dispostas de forma compactada em cordões, lâminas ou ninhos, e frequentemente são indiferenciadas, exibindo núcleos pequenos e hiperchromáticos, além de alta taxa mitótica (CASSALI et al., 2014). Outras características de malignidade incluem pobre delimitação celular, anisocariose e anisocitose moderadas a severas além de frequente infiltração de células neoplásicas em vasos linfáticos peritumorais (GOLDSCHMIDT et al., 2011). A existência de células com

citoplasma vacuolizado indica uma possível origem tumoral em células mioepiteliais (MISDORP, 2002; CASSALI et al., 2014).

Ao contrário do tipo histológico anterior, o padrão cribiforme de carcinoma é incomum em cães. É uma variação do carcinoma mamário sólido, onde as células estão unidas por pontes e arranjadas de maneira a delimitar lúmens pequenos e circulares, formando uma estrutura que lembra uma “peneira” (MISDORP, 2002; GOLDSCHMIDT et al., 2011). A ocorrência de anisocariose e anisocitose é moderada, com formato celular variando de poligonal a colunar, e tecido conectivo insterticial esparso. O número de mitoses é variável (GOLDSCHMIDT et al., 2011).

2.4.1.6.Carcinoma anaplásico

Caracterizado por ser altamente indiferenciado e agressivo, o carcinoma anaplásico apresenta um padrão de crescimento difusamente infiltrativo, justificando sua capacidade de recidivar precocemente e metastatizar com facilidade (CASSALI et al., 2014). É formado por células grandes, pleomórficas e que frequentemente apresentam núcleos bizarros ricos em cromatina, sendo algumas multinucleadas. É possível observar células invadindo o frioso estroma, além de alta taxa mitótica e muitas figuras atípicas (MISDORP et al., 1999; CASSALI et al., 2014).

A diferenciação histopatológica em relação a outras lesões inflamatórias pode ser difícil, uma vez que a característica infiltrativa do tumor geralmente evoca marcada reação tecidual caracterizada por proliferação de miofibroblastos, infiltração de linfócitos, células plasmáticas, mastócitos, e ocasionalmente, neutrófilos ou eosinófilos e macrófagos (GOLDSCHMIDT et al., 2011; CASSALI et al., 2014). Tal dificuldade também existe para a diferenciação entre carcinomas extremamente anaplásicos e rabdomiossarcomas igualmente indiferenciados (MISDORP et al., 1999; MISDORP, 2002).

2.4.1.7.Carcinoma em tumor misto

São neoplasias muito frequentes em cadelas, e que exibem um padrão histológico complexo, abrangendo componentes de origem epitelial e mesenquimal. (CASSALI et al.,

2014). O componente epitelial é maligno e o componente mesenquimal (que pode ser formado por tecido cartilaginoso, ósseo ou adiposo) é benigno (GOLDSCHMIDT et al., 2011). Podem conter focos de células epiteliais com elevado pleomorfismo, além de mitoses atípicas. As células epiteliais malignas frequentemente exibem crescimento infiltrativo, que pode ser identificado através da perda de continuidade da camada mioepitelial, associada a aglomerados celulares invadindo o estroma. Esse tipo histológico pode ser resultante da evolução maligna de lesões benignas pré-existentes, sendo possível observar a existência de tecido não-neoplásico sendo invadido pela proliferação carcinomatosa, ao exame histopatológico (CASSALI et al., 2014).

2.4.1.8. Tipos especiais de carcinoma

2.4.1.8.1. Carcinoma de células escamosas

É um tipo tumoral altamente infiltrativo e comumente associado a invasão de tecidos linfáticos, mas de ocorrência incomum nos cães. Apresenta uma arquitetura tecidual particular, com proliferação de células escamosas em forma de lâminas sólidas e cordões, com áreas de corneificação. As áreas tumorais periféricas são formadas por células basalóides, e o centro da lesão apresenta queratina laminada, onde células necróticas podem ser identificadas (MISDORP et al., 1999; MISDORP, 2002; CASSALI et al., 2014). As células tumorais possuem núcleos largos e produzem tonofilamentos em seus citoplasmas. Pontes intercelulares podem ser encontradas (GOLDSCHMIDT et al., 2011).

Histologicamente, o carcinoma de células escamosas originado na glândula mamária (ducto do teto ou células epiteliais ductais dos alvéolos mamários) é idêntico aos que tem início na pele ou em tecidos adjacentes, o que dificulta essa diferenciação (GOLDSCHMIDT et al., 2011). O carcinoma adenoescamoso é uma variação deste tipo histológico, que possui estruturas glandulares em sua formação, o que constitui um fator diferencial (MISDORP et al., 1999).

Alguns tumores podem ser caracterizados por infiltrados secundários de células inflamatórias, incluindo numerosos neutrófilos. Este padrão histológico deve ser diferenciado de processo inflamatório dos ductos mamários acompanhado por metaplasia de células escamosas ductais (MISDORP et al., 1999; GOLDSCHMIDT et al., 2011).

2.4.1.8.2.Carcinoma de células fusiformes

É formado por células fusiformes usualmente dispostas em padrão epitelial, às vezes sólido ou podendo conter alguns túbulos, mas acredita-se que alguns destes carcinomas possuam origem mioepitelial. Observa-se grupos de células neoplásicas envoltas por fibras reticulares (arquitetura histológica auxiliar na diferenciação dos fibrossarcomas) onde as células fusiformes são individualmente envoltas pelas referidas fibras (MISDORP et al., 1999; MISDORP, 2002). A confirmação do diagnóstico requer que pelo menos 80% da área tumoral possua características deste subtipo de carcinoma: citoplasma eosinofílico e frequentemente vacuolizado, com núcleo oval, vacuolado e contendo cromatina fragmentada (CASSALI et al., 2014).

Segundo Goldschmidt et al. (2011), a morfologia celular é insuficiente para se chegar ao diagnóstico diferencial, devendo o patologista recorrer à imunohistoquímica para diferenciação entre neoplasmas de células fusiformes de origem epitelial e mesenquimal. Neste contexto, são utilizados anticorpos específicos contra proteínas de células epiteliais (citoqueratinas) e de células mesenquimais (vimentina). A coloração positiva para citoqueratina confirma a origem epitelial da neoplasia, descartando tumores de origem mesenquimal, como o fibrossarcoma (CASSALI et al., 2014). Sua ocorrência em cães é incomum (MISDORP et al., 1999; CASSALI et al., 2014).

2.4.1.8.3.Carcinoma mucinoso

Este tumor não é bem descrito na literatura veterinária, considerando sua rara ocorrência e consequente escassez de estudos envolvendo fatores clínicos e patológicos, em animais (CASSALI et al., 2014). Ocorre proliferação de células epiteliais em padrão estrutural sólido, tubular ou papilar, e formação de espaços preenchidos por abundante material mucinoso, de coloração PAS positiva (MISDORP, 2002; CASSALI et al., 2014).

Pode ser uma variação de carcinoma simples ou complexo (MISDORP et al., 1999), mas segundo Cassali et al. (2014) ao menos 40% do crescimento tumoral neste tipo histológico é caracterizado pelo acúmulo de mucina predominantemente no lúmen ductal.

Quando ocorre difusão do material mucinoso através deste componente, têm-se o carcinoma mucinoso invasor. Segundo Goldschmidt et al. (2011) as células secretoras são positivas para citoqueratina (caracterizando sua origem epitelial), e deve-se diferenciar esse tipo tumoral do carcinoma complexo com abundante matriz extracelular do tipo mucinosa.

2.4.1.8.4.Carcinoma rico em lipídeos

Possui como principal característica histológica o crescimento expansivo através da proliferação de células com citoplasmas acentuadamente vacuolizados e ricos em lipídeos (MISDORP et al., 1999). Sua ocorrência é extremamente rara na espécie canina (MISDORP, 2002), mas pode ser encontrado em cadelas jovens e nulíparas, associado à invasão linfática local e metástase em linfonodos (GOLDSCHMIDT et al. 2011).

Dispostas em grupos sólidos ou cordões, as células neoplásicas são circulares ou ovais, estão separadas por quantidade moderada de estroma e comumente apresentam um único vacúolo citoplasmático deslocando o núcleo para a periferia celular (CASSALI et al., 2014). O aspecto nuclear é vesicular, com cromatina aglutinada, um ou dois nucléolos. Taxas de anisocariose e anisocitose são moderadas a severas, bem como de figuras celulares atípicas, e as figuras mitóticas estão presentes em quantidade variável (GOLDSCHMIDT et al., 2011). Segundo Cassali et al. (2014) o diagnóstico maligno é confirmado quando mais de 80% das células neoplásicas são secretoras de lipídeos. Ao contrário dos tipos mucinoso e secretório (outro tipo especial de carcinoma), as células neoplásicas dos carcinomas ricos em lipídeos são PAS negativa, o que torna esse tipo de coloração um dos auxiliares no diagnóstico diferencial. Já a caracterização imunohistoquímica através da marcação de citoqueratina e alfa actina demonstrou resultados variáveis.

2.4.1.9. Sarcomas

Os tumores malignos de tecidos mesenquimais (sarcomas) correspondem entre 10 a 15% das neoplasias mamárias em cães. Macroscopicamente são bem definidos e firmes à palpação. Sarcomas mamários estão associados a um prognóstico desfavorável, em função de sua alta tendência em recidivar e a formar metástases para linfonodos regionais e pulmões (MISDORP, 2002). Os tipos histológicos mais comuns são o fibrossarcoma e osteossarcoma

(MISDORP et al., 1999; CASSALI et al., 2014). A ocorrência de condrossarcomas e lipossarcomas é rara (MISDORP et al., 1999).

2.4.1.9.1.Fibrossarcoma

Esse tipo de sarcoma é caracterizado pela proliferação de células fusiformes em um padrão claramente entrelaçado (GOLDSCHMIDT et al., 2011). As células neoplásicas são revestidas por fibras colágenas e de reticulina, dispostas paralelamente ou a esmo (MISDORP et al., 1999; CASSALI et al., 2014). Possuem bordas celulares mal delimitadas, com pequena quantidade de citoplasma eosinofílico, núcleo oval e nucléolo de apresentação variável. Frequentemente esses tumores apresentam significativa quantidade de anisocariose e anisocitose, bem como de figuras mitóticas (GOLDSCHMIDT et al., 2011).

A diferenciação entre fibrossarcomas necróticos e hemorrágicos pode ser difícil em relação às lesões hemorrágicas encapsuladas ou abcessos. Via de regra, as áreas de hemorragia e necrose dos fibrossarcomas estão localizadas no centro do tumor, de modo que as áreas periféricas das lesões normalmente permitem um diagnóstico correto (MISDORP et al., 1999; MISDORP, 2002). O diagnóstico diferencial também deve incluir mioepiteliomas malignos, carcinomas de células escamosas (por imunohistoquímica) e hemangiopericitomas (GOLDSCHMIDT et al., 2011). Nestes últimos, observa-se um padrão vascular, onde as fibras colágenas se proliferam ao redor dos vasos sanguíneos de forma concêntrica (MISDORP et al., 1999).

2.4.1.9.2.Osteossarcoma

A produção de osteóide pelas células neoplásicas caracteriza esse tipo histológico de sarcoma. Observa-se proliferação de células com formato variando de fusiforme a estrelado (ou até oval) em meio à formação osteóide ou óssea (GOLDSCHMIDT et al., 2011). A matriz é mais densa no centro do tumor, ao passo que regiões periféricas possuem maior celularidade. Pleomorfismo celular e taxa mitótica geralmente são proeminentes (MISDORP et al., 1999). Apesar disso, tanto os tumores primários quanto suas metástases podem ser altamente diferenciados (MISDORP et al., 1999; MISDORP, 2002; CASSALI et al., 2014).

Essas neoplasias podem se apresentar como “osteossarcomas puros” ou “tumores combinados”. Nos últimos, o tecido ósseo maligno pode ser encontrado concomitantemente a componentes fibrosos e cartilaginosos, e até mesmo células adiposas (MISDORP et al., 1999; MISDORP, 2002; CASSALI et al., 2014). Diagnóstico diferencial deve incluir a formação óssea indireta que ocorre ao longo da fase intermediária de constituição do tecido cartilaginoso em condrossarcomas (MISDORP, 2002).

Sua ocorrência foi relacionada a pacientes com histórico de crescimento rápido e recente de massa tecidual pré-existente na glândula mamária já a algum tempo (até por anos), e posterior disseminação por via hematógena, principalmente para os pulmões (GOLDSCHMIDT et al., 2011).

2.4.1.9.3.Carcinosarcoma

Também denominado tumor misto maligno da glândula mamária (GOLDSCHMIDT et al., 2011; CASSALI et al., 2014), o carcinosarcoma é composto por células morfológicamente semelhantes aos componentes epiteliais malignos (células epiteliais luminais ou mioepiteliais) e por células semelhantes ao tecido conectivo maligno (elementos mesenquimais), sendo reconhecidas associações de todos os tipos de diferenciação carcinomatosa e sarcomatosa existentes (MISDORP et al., 1999; MISDORP, 2002; CASSALI et al., 2014).

Macroscopicamente, apresentam-se bem circunscritos e com superfície firme ao corte. É potencialmente metastático, podendo disseminar ambos ou apenas um dos componentes teciduais malignos (MISDORP, 2002). De acordo com Goldschmidt et al. (2011) os de natureza epitelial se disseminam via através de vasos linfáticos para os linfonodos regionais e pulmões, ao passo que componentes mesenquimais o fazem por via hematógena, para os pulmões.

2.4.2. Tumores benignos

2.4.2.1. Adenoma simples

Adenomas simples são neoplasias formadas pela proliferação benigna de um dos componentes epiteliais da glândula mamária (epitelial luminal ou mioepitelial), de rara ocorrência no cão (MISDORP et al., 1999). A multiplicação celular é uniforme, caracterizada por anisocariose, anisocitose e figuras mitóticas em quantidades mínimas. Macroscopicamente, são lesões nodulares não-infiltrativas e bem demarcadas, com suporte fibrovascular moderado a escasso (GOLDSCHMIDT et al., 2011).

Quando o componente epitelial está envolvido, o adenoma é do tipo tubular simples (MISDORP et al., 1999; CASSALI et al., 2014). Os túbulos são revestidos por uma única camada de células colunares ou cuboides, com quantidade moderada de citoplasma eosinofílico. O núcleo é central, de formato arredondado a oval, com nucléolo pequeno e também centralizado (GOLDSCHMIDT et al., 2011).

Tumores formados por células fusiformes, normalmente dispostas em padrão sólido, são denominados mioepiteliomas (MISDORP et al., 1999; CASSALI et al., 2014). Dispostas em feixes curtos misturados a uma matriz mixóide, as células apresentam pequena quantidade de citoplasma, núcleo hipocromático de formato arredondado, além de bordas pobramente demarcadas (GOLDSCHMIDT et al., 2011).

2.4.2.2. Adenoma complexo

Ao contrário dos adenomas simples, os do tipo complexo ou adenomioepiteliomas ocorrem com frequência em cães (MISDORP et al., 1999; MISDORP, 2002). Ambos os elementos epiteliais (luminal e mioepitelial) constituem o tumor, mantendo a mesma arquitetura histológica descrita anteriormente (para adenomas simples) (GOLDSCHMIDT et al., 2011), fazendo-se exceção à ausência de matrix mixóide neste tipo neoplásico, segundo Cassali et al. (2014). Entretanto, Misdorp (2002) faz referência à produção de substância tipo mucina pelas células mioepiteliais, que pode ser confundida com material condroide característico de tumores mistos benignos.

De acordo com Misdorp et al. (1999), Misdorp (2002) e Cassali et al. (2014), as seguintes características histológicas embasam o diagnóstico histopatológico para o referido

tumor: presença de cápsula, ausência de necrose e atipia, além de baixa atividade mitótica. No entanto, o diagnóstico diferencial pode ser difícil e deve incluir os tumores mistos benignos, fibroadenomas, hiperplasia lobular (MISDORP et al., 1999; MISDORP, 2002) e carcinomas complexos bem diferenciados (MISDORP et al., 1999; CASSALI et al., 2014).

2.4.2.3. Adenoma basalóide

A massa neoplásica é constituída por cordões e aglomerados de células epiteliais basalóides monomórficas, às vezes corneificadas (MISDORP et al., 1999; MISDORP, 2002) e frequentemente localizadas na região luminal de ductos ectásicos (daí o sinônimo Adenoma Ductal). Ocorre a formação de duas fileiras celulares distintas - uma luminal e outra basal. A primeira é constituída por células colunares a cuboidais, de margens relativamente indefinidas, citoplasma eosinofílico moderado a escasso. O núcleo, com proeminente nucléolo basofilico, possui localização variada. Taxas de anisocariose e anisocitose são variadas, com poucas figuras mitóticas (GOLDSCHMIDT et al., 2011). Na camada periférica, as células assumem arranjo em “paliçada” e estão orientadas de encontro à fina lámina basal, característica que diferencia o adenoma basalóide do tipo simples (MISDORP, 2002).

Esse tipo histológico costuma atingir pequenas dimensões, ser bem circunscrito e não desenvolver metástases. Casos raros de metastatização de massas tumorais com as referidas características histológicas têm sido reconhecidos como carcinoma com diferenciação escamosa (MISDORP, 2002). Entretanto, estudos adicionais se fazem necessários no intuito de melhor categorizar as lesões basalóides (MISDORP et al., 1999).

2.4.2.4. Fibroadenoma

O Fibroadenoma é um tumor benigno relativamente comum na cadeia, caracterizado pela proliferação de células epiteliais e estromais fibroblásticas, podendo haver células mioepiteliais concomitantemente. A existência do último componente pode dificultar o diagnóstico diferencial com adenomas complexos (MISDORP et al., 1999; MISDORP 2002).

No componente epitelial observa-se a formação de túbulos revestidos por células cuboidais ou colunares, com núcleo arredondado e uniforme. Já o estroma apresenta tecido conectivo frouxo com mucopolissacarídeos, e fibroblastos com margens mal demarcadas, núcleos alongados e pouco citoplasma. Entretanto, neoplasias em estágio avançado de desenvolvimento geralmente possuem o tecido conectivo denso e hialinização do estroma (GOLDSCHMIDT et al., 2011).

O estroma pode circundar as formações tubulares - fibroadenomas pericanaliculares ou periductais – ou comprimir os túbulos, levando à sua deformação – fibroadenomas intracanaliculares ou intraductais (MISDORP et al., 1999; CASSALI et al., 2014). Com relação ao padrão histológico de proliferação celular, podem apresentar baixa ou alta celularidade, sendo os últimos ricos em fibroblastos e figuras mitóticas (MISDORP et al., 1999).

2.4.2.5. Papiloma ductal

Consiste em uma massa ramificada ou lobulada, de rara ocorrência em cães, onde células do componente epitelial proliferaram de forma organizada, no interior de ductos distendidos (MISDORP et al., 1999). Também denominado adenoma papilar intraductal, demonstra um padrão de crescimento arborescente ou papilar, suportado por um eixo fibrovascular. As papilas podem se desenvolver em um único foco ou em vários ductos, de maneira multifocal (GOLDSCHMIDT et al., 2011). Os últimos devem ser diferenciados de papilomatose ductal, um tipo de lesão epitelial hiperplásica com um componente intraductal (MISDORP, 2002).

As células epiteliais luminais formam uma camada única no interior do ducto, possuem núcleos ovais normocrônicos e pequena quantidade de citoplasma eosinofílico. Áreas de hialinização do estroma com aprisionamento de elementos epiteliais estão ocasionalmente presentes (GOLDSCHMIDT et al., 2011). Atipia celular e taxas mitóticas são mínimas (CASSALI et al., 2014).

2.4.3. Lesões mamárias não neoplásicas

Alterações moleculares do epitélio mamário podem resultar em desordens de proliferação celular, como processos hiperplásicos e displásicos diversos. Todas as condições que refletem alterações proliferativas ou degenerativas do tecido mamário estão reunidas em um complexo denominado Doenças Fibrocísticas, basicamente caracterizado pela interação anormal entre componentes epiteliais e mesenquimais (MISDORP et al., 1999; MISDORP, 2002). Acredita-se que a maioria das proliferações celulares tenha início nos ductos mamários terminais, com evolução posterior para alterações hiperplásicas de ductos extralobulares (hiperplasia ductal) e/ou dos ductos intralobulares (hiperplasia lobular) (MISDORP et al., 1999).

Essas lesões são relativamente comuns em cães e acredita-se que representam estágios evolutivos da progressão de neoplasias malignas (CASSALI et al., 2014).

2.4.3.1. Hiperplasia ductal

É caracterizada pela proliferação, nos ductos mamários extralobulares, de células epiteliais luminais pequenas e uniformes, com núcleos igualmente padronizados e camada de células mioepiteliais bem definida. As hiperplasias difusas ou multifocais são denominadas epitelioses ou papilomatoses, e eventualmente conduzem à obstrução parcial ou total dos ductos (MISDORP et al., 1999; MISDORP, 2002; CASSALI et al., 2014). Na papilomatose o padrão de crescimento é papilar, sem sustentação por estroma fibrovascular (GOLDSCHMIDT et al., 2011).

As células possuem núcleo hiperchromático, com baixo grau de pleomorfismo e citoplasma escasso (GOLDSCHMIDT et al., 2011). Figuras mitóticas, assim como células atípicas normalmente existem em pequeno número ou estão ausentes. Presença de atipia celular moderada a exacerbada caracteriza a lesão como hiperplasia ductal atípica, que é considerada indicativa de desenvolvimento posterior de carcinoma ductal invasivo (MISDORP, 2002). Histologicamente, observam-se pequenas células com núcleos monomórficos formando pontes sólidas através do lúmen, com uma camada organizada de células mioepiteliais delimitando o ducto (CASSALI et al., 2014).

Segundo Cassali et al. (2014) a diferenciação entre lesão hiperplásica atípica e carcinoma *in situ* ductal de baixo grau é difícil. Estudos moleculares demonstraram que

ambas as lesões possuem alterações cromossômicas similares e compartilham papéis semelhantes na transformação maligna dos componentes celulares da glândula mamária (FERREIRA, 2010; FERREIRA et al., 2012).

2.4.3.2. Hiperplasia lobular

Misdorp et al. (1999) subdivide a hiperplasia lobular de acordo com o componente envolvido na proliferação:

- Hiperplasia epitelial: quando ocorre proliferação das células epiteliais luminas dos ductos intralobulares, mantendo-se um padrão de crescimento semelhante ao que ocorre na hiperplasia ductal.
- Adenose: reflete a proliferação não-neoplásica das unidades ductais intralobulares, que aumentam em número. Pode ocorrer crescimento intraductal, periductal ou de ambas as regiões, refletindo proporções variadas de componentes epiteliais, mioepiteliais e de tecido fibroso. Quando o crescimento do último é marcante, utiliza-se o termo adenose esclerosante.

Cassali et al. (2014) não consideram a adenose como um tipo de hiperplasia lobular, mas descrevem-nas como duas lesões distintas. Além disso, afirma a existência de um padrão de crescimento morfológicamente distinto nas hiperplasias ductal e lobular. Na última, observa-se a proliferação de células com núcleos pequenos e arredondados, centralmente posicionados, com baixo grau de pleomorfismo. Algumas vezes exibem vacúolo intracitoplasmático único. Ainda segundo os referidos autores, o acometimento de cinco ou mais unidades acinares denota o desenvolvimento de hiperplasia lobular atípica (que possui grande potencial de transformação maligna).

A adenose é uma lesão de ocorrência incomum em cães, que aparentemente não está relacionada a uma progressão neoplásica (CASSALI et al., 2014). Pode ser encontrada em tecido mamário adjacente a neoplasmas, mas em geral não exibem alterações atípicas (GOLDSCHMIDT et al., 2011).

2.4.3.3. Cistos

Podem exibir atrofia epitelial ou até mesmo hiperplasia com crescimento em padrão papilar. Geralmente são múltiplos, e por vezes associados à formação de doença fibrocística (MISDORP et al., 1999; MISDORP, 2002). São lesões mamárias incomuns em cães, formadas por células semelhantes às células epiteliais luminais e que possuem pelomorfismo e atividade mitótica moderada a baixa (JONES, HUNT, KING, 2000).

2.4.3.4. Ectasia ductal

Consiste em um processo de dilatação progressiva do sistema ductal mamário, cuja diferenciação em relação ao cisto pode ser difícil. Em geral, as ectasias são lesões de dimensões menores e origem ductal reconhecível. Por vezes, a perda da continuidade do revestimento epitelial ductal resulta em invasão do tecido lipídico estromal e consequente reação inflamatória local (MISDORP et al., 1999; MISDORP, 2002). Pode-se notar também deíbris necróticos, quantidade variada de macrófagos degenerados e traços de colesterol no lúmen. Esse processo pode ser secundário à obstrução luminal por neoplasias mamárias (GOLDSCHMIDT et al., 2011).

2.4.3.5. Fibrose focal ou fibroesclerose

É um termo utilizado para caracterizar a proliferação de tecido fibroso, que normalmente ocorre na maioria das displasias mamárias acima descritas. Não se refere a um diagnóstico final, mas se propõe a qualificar a lesão em questão. Hiperplasias lobulares e ductais podem apresentar a fibrose focal em sua constituição, por exemplo (MISDORP et al., 1999; MISDORP, 2002).

2.4.3.6. Ginecomastia

É a denominação dada ao aumento de volume da glândula mamária em cães machos, resultante da hiperplasia ductal e estromal. Esta condição geralmente reflete a síndrome de feminização em cães com sertoliomas (MISDORP et al., 1999; MISDORP, 2002).

2.5. HER-2: papel na carcinogênese dos tumores de mama em mulheres e na cadelas

Também denominado c-erBb2, HER-2 e HER2/neu, o HER-2 é um dos membros da família de receptores de fator de crescimento epidermal (família HER) e atua como proto-ocogene, ao exercer importante papel na regulação do crescimento, sobrevivência e diferenciação das células (GUTIERREZ, SCHIFF, 2011). Codifica uma proteína de mesmo nome, de localização transmembranar, composta por três domínios: extracelular, transmembranar e intracelular (Kraus, et al., 1989 apud Beselga, 2013), que assim como as demais proteínas da família HER, são fundamentais para o desenvolvimento de diversos órgãos e tecidos, em condições fisiológicas (FREITAS, 2008). Ainda não existe um ligante específico para o sítio extracelular de HER-2, e sabe-se que essa proteína pode sofrer heterodimerização como outro membro da família HER ou formar homodímeros (HER2:2) de forma espontânea, quando está expressa em níveis elevados no tecido (GUTIERREZ, CHIFF, 2011). Neste caso a proteína se torna ativada e capaz de transduzir sinais intracelulares que podem afetar o crescimento celular e desencadear eventos pré-neoplásicos como inibição da apoptose, migração e invasividade celular, e angiogênese (FREITAS, 2008).

Quando sofre mutação, o gene inicia a transformação celular neoplásica, estando diretamente envolvido na carcinogênese mamária (DUTRA et al., 2004). Isso decorre da ativação do ciclo de crescimento celular que resulta no surgimento de várias figuras mitóticas, anisocitose e anisocariose (MUHAMMADNEJAD et al., 2012). Aumento da produção de ligantes, ativação constitutiva devido a mutações, defeitos nos sistemas de inibição e reação cruzada com outros receptores, são alguns dos fatores que podem culminar com a desregulação de sua atividade (ZANDI et al., 2007).

Em humanos, existe evidência crescente de que os efeitos da amplificação do gene HER-2, que ocorre em 20 a 30% dos casos de câncer de mama, estão relacionados à sua capacidade de expandir populações de células tronco, resultando em aumento da invasividade das populações celulares. Esse evento geralmente se encontra associado a doenças

metastáticas agressivas (KORKAYA et al., 2008). A amplificação gênica é o principal mecanismo responsável pela superexpressão da proteína HER-2, e pode ser detectada em até 96,1% das neoplasias de mama em mulheres, cujas análises imunohistoquímicas revelam escore 3+ para superexpressão de HER-2 (OWENS, HORTEN, DA SILVA, 2004).

Apesar de ocorrer com maior frequência em carcinomas invasivos de alto grau e, portanto, estar relacionada à pior prognóstico nas mulheres, a superexpressão de HER-2 pode ser encontrada em lesões pré-malignas e carcinomas ductais *in situ*, sugerindo sua participação nos processos iniciais da tumorigênese (XU et al., 2002). Tanto a amplificação gênica quanto a superexpressão do produto protéico resultante, são mantidos ao longo das etapas subsequentes da progressão tumoral (RUNGSIPAT et al., 1999). Martín de Las Mulas (2003) não encontraram amplificação gênica em tecidos mamários que demonstraram sobreexpressão da proteína HER-2.

Na espécie canina, o gene HER-2 está localizado no cromossomo 1q13.1, que frequentemente exibe alterações cromossomais clonais em tumores caninos (MURUA ESCOBAR, BECKER, BULLERDIEK, 2001). Em seu estudo, Hsu e colaboradores (2009) não encontraram mutações biologicamente relevantes na região codificadora do HER-2 em tumores mamários caninos e sugerem que a superexpressão desta proteína talvez não esteja relacionada a mutações de nucleotídeos. Segundo esses autores, mecanismos moleculares como amplificação gênica, estimulação transcricional e falha no controle translacional podem estar envolvidos no aumento dos níveis de expressão de HER-2.

Apesar da intensificação das pesquisas nas últimas décadas, muitas das quais sugerem que esse biomarcador possui importante papel na carcinogênese mamária canina, o significado da superexpressão de HER-2 em cadelas ainda é controverso (BERTAGNOLLI, 2009). Segundo Burrai e colaboradores (2015), o número de estudos ainda é pequeno, e seus resultados variáveis prejudicam a elaboração de conclusões definitivas quanto à relevância do HER-2 na patogênese e prognóstico das neoplasias mamárias caninas. A variação da superexpressão de HER-2 pode refletir fatores como a sensibilidade dos métodos de detecção, nível de expressão do gene (amplificação, transcrição, tradução) e estágios das amostras tumorais (HSU et al., 2009).

Pesquisas apontam variações na superexpressão de HER-2 em tumores mamários de cadelas, de 17 a 35,4% (RUNGSIPAT et al., 1999; MARTÍN DE LAS MULAS et al., 2003; DUTRA et al., 2004; HSU et al., 2009; KIM et al., 2011 e BURRAI et al., 2015),

valores similares aos encontrados para carcinomas mamários humanos (BERTAGNOLLI, 2009). Na maioria dos estudos, a superexpressão de HER-2 foi encontrada apenas em tumores malignos (MARTÍN DE LAS MULAS et al., 2003; DUTRA et al., 2004; HSU et al., 2009; MUHAMMADNEJAD et al., 2012 e BURRAI et al., 2015.), com exceção de Rungripipat et al. (1999), Kim et al. (2011) e Ressel et al. (2013) que detectaram 50%, 16,7% e 27,3% de imunomarcação para HER-2 nos tumores benignos positivos, respectivamente. Ressel et al. (2013) acreditam que a probabilidade de existirem tumores mamários caninos com superexpressão de HER-2 aumenta com o número de amostras analisadas. Ainda segundo esses autores, níveis anormais da proteína podem estar envolvidas no crescimento celular de alterações neoplásicas benignas e hiperplásicas.

Estudos vêm sendo conduzidos no sentido de se identificar o real envolvimento de HER-2 como fator prognóstico nas lesões mamárias caninas. Em 2004, Dutra e colaboradores observaram que dos 13 tumores mamários caninos malignos que apresentaram superexpressão de HER-2, cinco (38,5%) eram grau II e três (23%) apresentavam grau histológico III, revelando correlação estatística positiva ($P=0,0017$) entre os níveis de expressão da proteína e o grau histológico.

Martín de las Mulas et al. (2003), encontraram superexpressão de HER-2 exclusivamente em tumores mamários malignos de cães (3/17 – 17,6%), associada à vários indicativos tumorais de prognóstico ruim, como tamanho tumoral expressivo, grau histológico III, comportamento invasivo de crescimento, tipo histológico simples e período livre de doença inferior a seis meses após a cirurgia de exérese de tumor de mama. Já nos estudos de Rungripipat et al. (1999), o aumento dos níveis de expressão de HER-2 foi avaliado em 79 TMC, dos quais 40,5% (32/79) eram tumores benignos e 59,5% (47/79) eram malignos. Desta análise, encontraram superexpressão de HER-2 em 31,6% (25/79) do total de TMC analisados, sendo a maior imunoreatividade positiva (50,0% - 16/32) nos tumores benignos, seguido pelos tipos histológicos malignos (19,1% - 9/47). Para esses autores, a ativação desta proteína pode ocorrer ainda durante as etapas iniciais de desenvolvimento do TMC, e possuir importante papel na progressão maligna da neoplasia, devendo ser usado como indicador prognóstico em cadelas com tumores de mama.

Ao contrário, Hsu et al. (2009), correlacionaram a superexpressão encontrada em tumores mamários caninos malignos à maior sobrevida em cães submetidos à remoção cirúrgica dos tumores. Esses autores sugerem que o HER-2 desempenha um papel na formação dos tumores, mas que o desenvolvimento de malignidade pode não estar associado

ao aumento dos níveis de expressão desta proteína. Já Ressel e colaboradores (2013) não encontraram nenhuma relação entre a superexpressão de HER-2 e o tempo global de sobrevida das cadelas. Estes autores acreditam que o aumento da expressão desta proteína não pode ser associado ao período livre de doença na espécie canina, como ocorre nas mulheres.

Na oncologia humana, a demonstração imunohistoquímica (IHC) da superexpressão de HER-2 representa um método simples e confiável para examinar o nível de expressão da proteína, sendo capaz de fornecer resultados semelhantes a métodos-padrão, como hibridização fluorescente *in situ* (FISH) (JACOBS et al., 1999; KAYA et al., 2001). A elegibilidade de pacientes a serem submetidas a terapias específicas anti-HER-2 utiliza como critério a superexpressão de HER-2, que pode ser avaliada tanto por IHQ como por FISH. A Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) recomenda que a IHQ seja utilizada como método de triagem (uma vez que está amplamente disponível para uso de rotina) e que FISH seja realizado como teste confirmatório em resultados de IHC limítrofes ou duvidosos (WOLFF et al., 2013).

A maioria dos estudos que determinaram superexpressão de HER-2 em TMC disponíveis na literatura até então (RUNGSIPAT et al., 1999; MARTIN DE LAS MULAS et al., 2003; DUTRA et al., 2004; HSU et al., 2009; KIM et al., 2011; BURRAI et al., 2015) utilizaram o método HerceptTest para a interpretação do nível de expressão de HER-2. Neste método, a superexpressão é avaliada através dos escores, sendo escore 3+ considerado superexpressão de HER-2 quando visualiza-se marcação forte e completa da membrana celular em mais de 10% das células tumorais; escore 2+ resultado inconclusivo, quando ocorre marcação moderada e completa em mais de 10% das células neoplásicas; escore 1+ ausência de superexpressão de HER-2 caracterizada por marcação fraca e incompleta da membrana celular em mais de 10% das células tumorais; e escore 0 ausência de expressão de HER-2 demonstrada pela inexistência de marcação das membranas das células neoplásicas.

Estudos prévios confirmam a reatividade cruzada entre os anticorpos anti-HER-2 humana e tecidos caninos (RUNGSIPAT et al., 1999; MARTIN DE LAS MULAS et al., 2003; HSU et al., 2009), e, portanto, a efetividade de seu uso na determinação do status de HER-2 em tecidos mamários caninos. Por outro lado, Burrai et al. (2015) consideram a necessidade da realização concomitante de testes como western immunoblotting, matriz de proteína de fase reversa e espectrometria de massa, para comprovar a eficiência do anticorpo anti- HER-2 humano na detecção da proteína canina. Segundo esses autores, resultados acerca de imunohistoquímica para marcação de HER-2 canino podem ser influenciados pela

falta de especificidade dos anticorpos anti HER-2 e/ou reatividade cruzada com outros membros da família HER. Pode haver interferência no reconhecimento da proteína HER-2 canina em estado inativo ou desnaturada, por exemplo.

REFERÊNCIAS

BANKS, W. J. Tecido tegumentar. In: **Histologia Veterinária Aplicada**. 1. ed. São Paulo: Manole, 1991. p. 391-423.

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

BERTAGNOLLI, A. C. **Tumores mamários mistos caninos**: análise do DNA mitocondrial e da expressão protéica de HER-2 e EGFR nos componentes epitelial e mesenquimal. 2009. 94 f. Tese (Doutorado em Patologia Geral), Programa de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/ECJS-7SVHRX/ang_lica_cavalheiro_bertagnolli.pdf?sequence=1>. Acesso em: 11 abr. 2016.

BESELGA, A. G. **Avaliação da expressão do recetor HER-2 em carcinomas mamários caninos**. 2013. 91 f. Dissertação (Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2013.

BOURGEOIS, P.; FRÜHLING, R. Contralateral internal mammary invasion in breast cancer: lymphoscintigraphy data. **The Breast**, v. 8, n. 3, p. 107-109, 1999.

BURRAL, G. P. et al. Investigation of HER-2 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.

CARREÑO, M. S. R.; PEIXOTO, S.; GIGLIO, A. Reposição hormonal e cancer de mama. **Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia**, n. 7, p. 41- 50, 1999.

CASSALI, G. D. **Estudos morfológicos, imunohistoquímicos e citométrico de tumores mamários da cadelas – aspectos comparativos com neoplasias da mama humana**. 2000. 73f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Programa de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

CASSALI, G. D. et al. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors – 2013. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 7, n. 2, p. 38 – 69, 2014.

CEROVŠEK M, et al. Clinicopathological survey of 56 canine malignant mammary tumours in Slovenia - Prognostic value of clinical stage and histological grade. **Slovenian Veterinary Research**, v. 50, n. 3, p. 93–102, 2013.

CHANG, C. C. et al. Evaluation of Hormone Receptor Expression for Use in Predicting Survival of Female Dogs With Malignant Mammary Tumors. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 235, n. 4, p. 391-396, 2009.

CHUN, R.; THAMM, D. H. Targeting angiogenesis and tumor vasculature. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. **Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology**. 4. ed. Philadelphia: Saunders, 2007. cap. 14, p. 259-266.

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

COSTA, S.D. et al. Factors influencing the prognostic role of oestrogen and progesterone receptor levels in breast cancer. **European Journal of Cancer**, v. 38, n. 10, p. 1329-1334, 2002.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2000. 1400 p.

DAVIDSON, A. P.; STABENFELDT, G. H. The Mammary Gland. In: CUNNINGHAM, J.G.; G.K. KLEIN, B. G. **Textbook of veterinary physiology**. 4. ed. Missouri: Saunders Elsevier, 2007, cap. 39, p. 501-525.

DAGLI, M. L. Z. The search for suitable prognostic marker for canine mammary tumors: A promising Outlook. **Veterinary Journal**, v. 177, n. 1, p. 3-5, 2008.

DALECK, C. R. et al. Aspectos clínico e cirúrgicos do tumor mamário canino. **Ciência Rural**, v. 28, n. 1, p. 95-100, 1998.

DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; SOUSA, R. S.; COSTA, T. A.; MACEDO, T. R.; RODIGHERI, S. M.; RIOS, A.; PIEKARZ, C. H. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, v. 7, n. 2, p. 15-26, 2002.

DENG, C.; BRODIE, S.G. Knockout mouse models and mammary tumorigenesis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 11, n. 5, p. 387-394, 2001.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. In: _____. **Tratado de Anatomia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997, 834p.

DUTRA, A. P. et al. 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. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjmbr/v37n11/5115.pdf>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**, v. 19, n. 5, p. 403-410, 1991. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x/epdf>>. Acesso em: 12 ago. 2016.

EVANS, H. E.; CHRISTENSEN, G. C. The reproductive organs. In: MILLER, M. E. **Miller's anatomy of the dog**. 3. ed. Philadelphia: Saunders, 1993. p. 504-558.

FELICIANO, M. A. R. et al. Neoplasia mamária em cadelas – revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de medicina Veterinária**, Ano IX, n. 18, 2012. Disponível em: <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/k6okLJJ2PaKkJ7J_2013-6-28-18-15-30.pdf>. Acesso em: 14 abr. 2016.

FERREIRA, E. et al. Histological and immunohistochemical identification of atypical ductal mammary hyperplasia as a preneoplastic marker in dogs. **Veterinary Pathology**, v. 49, n. 2, p. 322-329, 2012. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/0300985810396105>>. Acesso em: 10 maio. 2016.

FERREIRA, E. **Análise histomorfológica, imuno-histoquímica e de hibridização cromogênica *in situ* em lesões mamárias epiteliais ductais não neoplásicas de cadelas**, 2010. 101 f. Tese (Doutorado em Patologia Geral) – Programa de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

FIGHERA, R. A. et al. Causas de morte e razões para eutanásia de cães da Mesorregião do Centro Ocidental Rio- Grandense (1965-2004). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 223-230, 2008.

FOSSUM, T. W. Surgery of the reproductive and genital systems. In: FOSSUM, T.W. et al. **Small animal surgery**. 3. ed. Missouri: Mosby Elsevier, 2007. p. 729-739.

FREITAS, C. S. Estendendo o Conhecimento sobre a Família Her – Receptores para o Fator de Crescimento Epidérmico e seus ligantes às Malignidades Hematológicas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 54, n. 1, p. 79-86, 2008.

GAMA, A.; ALVES, A.; SCHMITT, F. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. **Virchows Archiv**, v. 453, n. 2, p. 123-132, 2008.

GERALDES, M.; GÄRTNER, F.; SCHMITT, F. N. A immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours. **Veterinary Record**, v. 146, n. 14 p. 403-406, 2000.

- GOLDSCHMIDT, M. et al. Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*, v. 48, n. 1, p. 117–131, 2011. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985810393258>>. Acesso em: 06 jan. 2016.
- GUNDIM, L. F. et al. Clinical staging in bitches with mammary tumors: Influence of type and histological grade. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 80, n. 4, p. 318–322, 2016.
- GUYTON, A. C. **Tratado de fisiologia médica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 864p.
- GUTIERREZ, C.; SCHIFF, R. HER2: biology, detection, and clinical implications. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 135, n. 1, p. 55–62, 2011.
- HEDLUND, C. S. Cirurgia do sistema reprodutivo e genital. In: FOSSUM, T. W. **Cirurgia dos pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2002. cap. 23, p. 596-601.
- HELLMÉN, E. Complex mammary tumours in the female dog: a review. **Journal of Dairy Research**, v. 72, n. 1, p. 90-97, 2005.
- HELLER, D. A. et al. Cyclooxygenase-2 expression is associated with histologic tumor type in canine mammary carcinoma. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 6, p. 776–780, 2005.
- HENDERSON, B. E.; FEIGELSON, H. S. Hormonal carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 427-433, 2000.
- HICKS, D. G.; KULKARNI, S. HER-2 + Breast Cancer: Review of biologic relevance and optimal use of diagnostic tools. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 129, n. 2, p. 263-273, 2008. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ajcp/article-lookup/doi/10.1309/99AE032R9FM8WND1>>. Acesso em: 05 abr. 2016.
- HORTA, R. S. et al. Fatores prognósticos e preditivos dos tumores caninos definidos com auxílio da imuno-histoquímica. **Ciência Rural**, v. 42, n. 6, p. 1033-1039, 2012.
- HSU, W.L. et al. Increased survival in dogs with malignant mammary tumors 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.
- JACOBS, T. W. et al. Comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of HER-2/neu in breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 17, n. 7, p. 1974–1982, 1999. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10561247>>. Acesso em: 15 mai. 2016.
- JONES, T. C; HUNT, R. D; KING, N. W. Sistema genital. In: **Patologia Veterinária**. 6. ed. São Paulo: Manole, 2000. cap. 25, p. 1169 – 1244.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Aparelho reprodutor feminino. In: **Histologia básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. cap. 22, p. 431-451.

KAYA, H. et al. Her-2/neu gene amplification compared with HER-2/neu protein overexpression on ultrasound guided core-needle biopsy specimens of breast carcinoma. **Pathology and Oncology Research**, v. 7, n. 4, p. 279-283, 2001.

KIM, J. H. et al. Expression of HER-2 and nuclear localization of HER-3 protein in canine mammary tumors: histopathological and immunohistochemical study. **The Veterinary Journal**, v. 189, n. 3, p. 318-322, 2011.

KLOPFLEISCH, R. et al. Molecular Carcinogenesis of Canine Mammary Tumors: News From an Old Disease. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 98-116, 2011.

KORKAYA, H. et al. HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion. **Oncogene**, v. 23, n. 27, p. 6120-6130, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2602947/pdf/nihms80355.pdf>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

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

LEE, C. H. et al. Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. **Journal of Veterinary Science**, v. 5, n. 1, p. 63-69, 2004.

LOURO, I. D. Oncogenética. **Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia**, v. 11, p. 36-42, 2000.

MARTIN DE LAS MULAS, J. et al. Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 80, n. 3, p. 363-367, 2003.

MARTINS, D. C.; FERREIRA, A. M. R. Marcadores prognósticos como um auxílio à conduta clínico- cirúrgica em uma cadela apresentando múltiplos nódulos mamários. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 189-191, 2003.

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

MEUTEN, D. J. **Tumors in domestic animals**. 4. ed. Iowa State: Universidade da California, 2002. 788 p.

MILLANTA, F. et al. Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. **Research Veterinary Science**, v. 79, n. 3, p. 225-232, 2005.

MILLANTA, F. et al. COX-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. **Breast Cancer Research Treatment**, v. 98, n. 1, p. 115–120, 2006.

MISDORP, W. et al. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. In: (Eds), WORLD HEALTH ORGANIZATION. **International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals**. WHO, 2. ed. Geneva: Switzerland, 1999. v. 7, p. 11-58.

MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in domestic animals**. 4. ed. Iowa: Iowa State Press, 2002. p. 575-606.

MORRIS, J.; DOBSON, J. Mammary gland. In: _____. **Small Animal Oncology**, Blackwell Science, 2001. p. 184-191.

MUHAMMADNEJAD, A et al. Overexpression of her-2/neu in malignant mammary tumors; Translation of clinicopathological features from dog to human. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 12, p. 6415–6421, 2012.

MURUA ESCOBAR, H.; BECKER, K.; BULLERDIEK, J. The canine ERBB2 gene maps to a chromosome region frequently affected by aberrations in tumors of the dog (*Canis familiaris*). **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 94, n. 3-4, p. 194–195, 2001.

NUNES, C.B. **Estudo imunoistoquímico comparativo entre seis anticorpos anti-HER2 em arrays de carcinomas mamários: correlação com hibridação in situ cromogênica e avaliação interobservador**. 2007. 97 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Médica) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

O'KEEFE, D. A. Tumor do sistema genital. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. 1. ed. São Paulo: Manole, 1997. v. 2, cap. 131, p. 2344-2351.

OLIVEIRA FILHO, J. C. et al. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 177-185, 2010.

OLIVEIRA, L. O. et al. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, n. 2, p. 105-110, 2003.

ORUCEVIC, A. et al. Is the TNM staging system for breast cancer still relevant in the era of biomarkers and emerging personalized medicine for breast cancer - an institution's 10-year experience. **The Breast Journal**, v. 21, n. 2, p. 147–154, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25600504>>. Acesso em: 04 fev. 2016.

OWEN, L. N. **TNM Classification of Tumors in Domestic Animals**. 1. ed. Geneva: World Health Organization, 1980, p. 20-80.

OWENS, M. A.; HORTEN, B. C.; DA SILVA, M. M. HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. **Clinical Breast Cancer**, v. 5, n. 1, p.63-69, 2004.

PATSIKAS, M. N.; DESSIRIS, A. The lymph drainage of the mammary glands in the bitch: a lymphographic study, part II: the 3rd mammary gland. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 25, n. 139–143, 1996. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8766409>>. Acesso em: 11 fev. 2016.

PATSIKAS, M. N. et al. The lymph drainage of the neoplastic mammary glands in the bitch: a lymphographic study. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 35, n. 4, p. 228–234, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16836586>>. Acesso em: 08 mar. 2016.

PEÑA, L. et al. Prognostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with two-year follow-up: Relationship with clinical and histological characteristics. **Veterinary Pathology**, v. 50, n. 1, p. 94–105, 2013.

PEREIRA, C. P. et al. Estudo anatômico comparativo da vascularização linfática mamária em cadelas sadias e acometidas por neoplasias. **Brazilian Journal of Morphology Science**, v. 17, n. 490, p. 135, 2000.

PEREIRA, C.T. et al. Lymphatic drainage on healthy and neoplastic mammary glands in female dogs: can it really be altered? **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 32, n. 5, p. 282-290, 2003.

PEREZ, E. A. et al. HER2 testing: current status and future directions. **Cancer Treatment Reviews**, v. 40, n. 2, p. 276–284, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24080154>>. Acesso em: 13 jun. 2016.

PÉREZ ALENZA D. et al. Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 12, n. 3, p. 132–139, 1998.

QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos – novas perspectivas. In: CONGRESSO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 2002, Oeiras. **Anais...** Oeiras, PI, 2002. p. 183-190.

QUEIROGA, F. L. et al. Cox-2 levels in canine mammary tumors, including inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological features and prognostic significance. **Anticancer Research**, v. 25, n. 6B, p. 4269–4275, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16309227>>. Acesso em: 30 abr. 2016.

RAKHA, E. A.; ELLIS, I. O. Triple-negative/basal-like breast cancer: review. **Pathology**, v. 41, n. 1, p. 40-47, 2009. Disponível em: <[http://www.pathologyjournal.rcpa.edu.au/article/S0031-3025\(16\)32061-X/pdf](http://www.pathologyjournal.rcpa.edu.au/article/S0031-3025(16)32061-X/pdf)>. Acesso em: 10 out. 2016.

RAKHA, E. A. et al. Pathobiological aspects of basal-like breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 113, n. 3, p. 411-422, 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10549-008-9952-1>>. Acesso em: 10 out. 2016.

RESSEL, L. et al. 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.

RUNGSIPAT, A. et al. Immunohistochemical Analysis of c-yes and c-erbB-2 Oncogene Products and p53 Tumor Suppressor Protein in Canine Mammary Tumors. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 61, n. 1, p. 27–32, 1999.

RUTTEMAN, G. R.; WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. **Small animal clinical oncology**. 2. ed. Philadelphia: Sanders, 2001. p. 455-477.

SALAS, Y. et al. Epidemiological Study of Mammary Tumors in Female Dogs Diagnosed during the Period 2002-2012: A Growing Animal Health Problem. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. 1-15, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4436381/pdf/pone.0127381.pdf>>. Acesso em: 09 jul. 2016.

SANTOS, A. A. et al. Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. **BMC Veterinary Research**, v. 9, n. 1, 2013.

SARTIN, E.A. et al. Estrogen and progesterone receptor status of mammary carcinomas and correlation with clinical outcome in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 11, p. 2196-2200, 1992.

SASSI, F. et al. Molecular based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. **BMC Veterinary Research**, v. 6, n. 5, 2010. Disponível em: <<http://bmvcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-6148-6-5>>. Acesso em: 10 out. 2016.

SAKAMOTO, S. S. **Identificação de elementos traço em tumores de mama de cadelas e sua correlação com histopatologia e prognóstico de vida**. 2011. 92 f. Dissertação (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica) – Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2011.

SEIXAS, F. et al. Mammary invasive micropapillary carcinoma in cats: clinicopathologic features and nuclear DNA content. **Veterinary Pathology**, v. 44, n. 6, p. 842-848, 2007.

SHAFIEE, R. et al. Diagnosis, classification and grading of canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: an Clinico-Cytohistopathological study with environmental factors influencing public health and medicine. **Cancer Cell International**, v. 13, n. 79, 2013. Disponível em: <<http://www.cancerci.com/content/13/1/79>>. Acesso em 13. Out. 2016.

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

SLEECKX, N. et al. Canine Mammary Tumours, an Overview. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 1112–1131, 2011.

SONNENSCHEIN, E. G. et al. Body conformation, diet, and risk of breast cancer in pet dogs: a case-control study. **American Journal of Epidemiology**, v. 133, n. 7, p. 694–703, 1991.

SORENMO K.U. Canine mammary gland tumors. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 33, n. 3, p. 573-596, 2003.

SORENMO, K. U. et al. Canine mammary gland tumors; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. **Veterinary Comparative Oncology**, v. 7, n. 3, p. 162–172, 2009.

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

SOUZA, D. M. B. **Caracterização patológica e gênica (gene p53) dos tumores mamários em cadelas.** 2006. 93 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2006.

STRATMANN, N. et al. Mammary tumor recurrence in bitches after regional mastectomy. **Veterinary Surgery**, v. 37, n. 1, p. 82-86, 2008.

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

VAN LEEUWEN, I. S. et al. P53 mutations in mammary tumor cell lines and corresponding tumor tissues in the dog. **Anticancer Research**, v. 16, n. 6B, p. 3737-3744, 1996. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9042250>>. Acesso em: 18 jun. 2016.

VELDHOEN, N. et al. Identification of tumour-associated and germ line p53 mutations in canine mammary cancer. **British Journal of Cancer**, v. 81, n. 3, p. 409-415, 1999.

WILSON, G. P.; HAYES, H. M. **Cirurgia de Pequenos Animais**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1980. 362 p.

WOLFF, A. C. et al. 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.

XU, R. et al. Amplification of Her-2/neu Gene in Her-2/neu–Overexpressing and –Nonexpressing Breast Carcinomas and Their Synchronous Benign, Premalignant, and Metastatic Lesions Detected by FISH in Archival Material. **Modern Pathology**, v. 15, n. 2, p. 116-124, 2002.

ZANDI, R. et al. Mechanisms for oncogenic activation of the epidermal growth factor

receptor. **Cellular Signalling**, v. 19, n. 10, p. 2013–2023, 2007.

ZUCCARI, D. A. P. C.; SANTANA, A. E.; ROCHA, N. S. Correlação entre a citologia aspirativa por agulha fina e a histologia no diagnóstico de tumores mamários de cadelas. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v. 38, n. 1, p. 38-41, 2001.

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

CAPÍTULO 2 - Estudo Retrospectivo de 947 Lesões Mamárias em Cadelas –

Uberlândia, MG, Brasil.

Retrospective Study of 947 Mammary Injuries in Bitches – Uberlândia, Minas Gerais,

Brazil

(Artigo a ser submetido no periódico **Acta Scientiae Veterinariae**)

Estudo Retrospectivo de 947 Lesões Mamárias em Cadelas – Uberlândia, MG,

Brasil.

Retrospective Study of 947 Mammary Injuries in Bitches – Uberlândia, Minas Gerais,

Brazil

Mariana Batista Andrade¹, Ednaldo Carvalho Guimarães², Arlinda Flores Coleto¹,

Nicolle Pereira Soares¹ & Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi³

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. Correspondência: mbatistaandrade@gmail.com. Av, Teresina, 1755. Bairro Umuarama. CEP: 38.405-324.

²Faculdade de Matemática, UFU. Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

12 ³Laboratório de Patologia Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, UFU. Uberlândia,
13 Minas Gerais, Brasil.

ABSTRACT

16 **Background:** Mammary tumors are the type of neoplasia most commonly found in bitches
17 and are mostly malignant. The aim of this study was to determine the prevalence of mammary
18 tumors in bitches in the Laboratory of Veterinary Pathology of the Federal University of
19 Uberlândia (LPV-UFU) from 2004 to 2014, as well as to verify the relationship between
20 epidemiological aspects (age and breed) and clinicopathological aspects (ulceration, tumor
21 size and malignancy) in the occurrence of tumors.

22 **Materials, Methods & Results:** A retrospective study was carried out using the
23 histopathological information of the LPV-UFU database. We collected information of age and
24 breed of female dog, as well as location, macroscopic aspects and histological diagnosis of
25 mammary lesions. Only females were considered for analysis, totaling 911 histopathological

26 protocols analyzed, and 36 protocols presented more than one diagnosis of mammary tumor.
27 The ages of bitches ranged from one year to 20 years, with a mean of 9.99 years for the
28 occurrence of mammary lesions. Regarding the breed, 39.56% (288/728) of the bitches with
29 mammary lesions were undefined, and 20.19% (147/728) of the Poodle breed. Regarding the
30 location, the inguinal glands were the most affected by malignant tumors ($p < 0.05$). A
31 prevalence of tumors bigger than 5 cm in diameter (T3) in elderly animals ($p = 0.0154$) and in
32 inguinal mammary glands ($p = 0.044$) was observed. Simple carcinoma was the most frequent
33 histological type.

34 **Discussion:** Researches show that more than 40% of the tumors in bitches are located in the
35 mammary glands, emphasizing the importance of this type of neoplasia in female dogs.
36 Mammary tumors develop more frequently in middle-aged and elderly bitches, with the
37 highest occurrence in the age range of 8 and 10 years, corroborating this study, in which the
38 mean age of bitches was 9.99 years. It was observed a higher incidence in mongrel bitches in
39 comparison to the Poodle breed in this survey. Some authors affirm that there is no racial
40 predisposition for the occurrence of this pathology, however, a compilation of information
41 suggests a predisposition of at least 10 breeds, with involvement of a not yet identified genetic
42 component. Of these, six breeds were found in this study: Poodle, Cocker Spaniel, Pointer,
43 Maltese, Yorkshire Terrier and Dachshund. The percentage of malignant tumors (49.23%)
44 found in inguinal glands is consistent with findings from the literature, and may be associated
45 with a greater amount of parenchyma, abundance of hormone receptors in these glands, and
46 vascularization provided by the caudal superficial epigastric artery and vulvar branches of
47 external pudendal artery. Tumor size is considered a prognostic factor, and those with a
48 diameter equal to or less than 3 cm (T1) have a better prognosis. Consequently, the prevalence
49 of T3 in elderly animals is probably related to the malignancy of the lesions, since tumors
50 usually progress to a worse histological grade with the time passage. The higher occurrence of

51 T3 in inguinal glands may be related to their abundance of parenchyma and/or hormonal
52 receptors. As in the present study, data from literature refer to the superiority of malignant
53 histological types, with prevalence varying between 68 and 91%. When prolonged, the time
54 between onset of tumor and clinical evaluation may be determinant in the progression from
55 benign to malignant tumors. Among malignant neoplasms, the simple carcinoma presented
56 greater occurrence, followed by the mixed tumors with carcinoma, agreeing with several
57 studies. It is concluded that mammary tumors are more prevalent in older mongrel dogs and
58 Poodle. Attention should be paid to inguinal mammary tumors, since these were mainly by
59 malignant tumors.

60 **Keywords:** mammary tumor, canine, prevalence, prognostic factors, carcinoma.

61

62 INTRODUÇÃO

63 Os tumores mamários caninos (TMC) representam uma importante parcela da
64 casuística dos atendimentos clínico-cirúrgicos em clínicas veterinárias. Cerca de 25% a 50%
65 dos tumores caninos são mamários, e destes, metade são malignos [8]. Em estudo realizado
66 no Rio Grande do Sul - Brasil, os TMC malignos representaram 25,8% dos casos de óbito em
67 cães por neoplasias [13].

68 Diferentes fatores podem influenciar o desenvolvimento de tumores de mama em
69 cadelas, dentre eles fatores epidemiológicos como idade e raça, além de localização, tamanho
70 dos nódulos e tipos histológicos [22,24]. O estudo continuado da frequência de tumores e suas
71 características clinicopatológicas pode contribuir para determinação de fatores de prognóstico
72 confiáveis a serem adotados em cadelas, assim como ocorre em mulheres.

73 Dada a importância dos tumores de mama em Medicina Veterinária, o objetivo do
74 presente trabalho foi determinar a prevalência de lesões mamárias diagnosticadas em cadelas

75 no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (LPV-UFG),
76 no período de 2004 a 2014, e verificar a relação entre aspectos epidemiológicos (idade e raça)
77 e clínico-patológicos (ulceração, tamanho do tumor e comportamento biológico) na ocorrência
78 dos tumores de mama.

79

80 MATERIAIS E MÉTODOS

81 Procedeu-se a análise dos protocolos histopatológicos do acervo do LPV-UFG,
82 registrados entre os anos 2004 e 2014. Obteve-se o número total de laudos histopatológicos
83 emitidos em cães (de ambos os sexos), e laudos histopatológicos exclusivamente de cadelas.
84 Destes últimos, selecionou-se todos os laudos relativos a alterações anatomo-patológicas das
85 mamas - lesões neoplásicas e lesões não-neoplásicas (LNN). Dos referidos documentos
86 extraiu-se as seguintes informações: sexo, idade, raça, glândula mamária afetada, tamanho
87 da(s) lesão(ões), presença ou não de ulceração e tipo histológico da lesões mamárias.

88 Quanto à idade, os animais foram divididos em três grupos: filhotes (Fi) (abaixo de um
89 ano de idade), adultos (A) (de um a oito anos de idade) e idosos (I) (acima de oito anos de
90 idade) [32].

91 Utilizou-se o sistema TNM, originalmente proposto por Owen em 1980 e reformulado
92 por Rutteman, Withrow e MacEwen em 2001 [19], como referência nesse estudo, sendo: T1-
93 lesões menores que 3 cm; T2- lesões com 3 a 5 cm; T3- lesões maiores que 5 cm. Quanto à
94 localização das lesões nas mamas, considerou-se as regiões: torácica (tr), abdominal (ab) e
95 inguinal (in).

96 As lesões mamárias foram revisadas e reclassificadas segundo Cassali et al.[6] e os
97 distúrbios neoplásicos foram divididos em benignos (B) e malignos (M) e incluídos na análise
98 estatística, e as LNN foram registradas em prevalência e percentual.

99 Além disso, verificou-se a existência de dependência entre as diversas variáveis
100 incluídas no estudo (epidemiológicas e clinicopatológicas). O tipo de comportamento tumoral
101 (M ou B) foi correlacionado com idade, raça (sendo avaliadas as 11 raças mais frequentes),
102 localização e presença (ou não) de ulceração; o tamanho do tumor foi correlacionado à idade,
103 raça, localização e ulceração.

104 Para verificar a relação de dependência entre duas variáveis, foi utilizado o teste de
105 Qui-quadrado. Mediante dependência verificada, realizou-se comparação entre duas
106 proporções através do teste da binomial. O processamento das duas análises se deu através da
107 ferramenta Action (2015) [1] que utiliza o programa R (R Development Core Team, 2015)
108 [26,2]. Para a comparação de mais de duas proporções foi utilizado o teste de comparação
109 múltipla entre proporções [4], sendo utilizado o programa R. Todas as análises foram feitas
110 considerando-se significância de 5%.

111

112 **RESULTADOS**

113 Resgatou-se um total de 2.802 protocolos histopatológicos de animais da espécie
114 canina, nos anos de 2004-2014. Destes, 914 (32,61%) correspondiam a biopsias de lesões de
115 mama em cães, sendo 911 (99,68%) de fêmeas, 2 (0,22%) de machos e 1 (0,1%) protocolo
116 sem informação do sexo.

117 Considerou-se para análise estatística apenas as fêmeas, sendo que 36/911 protocolos
118 apresentaram mais de um diagnóstico de tumor de mama. Dentre as cadelas que apresentaram
119 tumor de mama (incluindo tumores benignos e malignos), a média de idade foi de 9,99 anos,
120 variando entre um e 20 anos. Observou-se média de 9,66 anos para cadelas com tumores
121 benignos e 10,07 para aquelas com tumores malignos.

122 Os tumores foram mais frequentes em animais idosos (55,3%) do que em animais adultos
123 (44,3%). Apesar disso, não houve relação entre as variáveis idade e tipo de comportamento
124 tumoral (B e M) na amostragem estudada ($p= 0,514$).

125 Houve alta prevalência de cães sem raça definida (SRD) (39,56%) acometidos por
126 tumores de mama, em relação aos demais. Das 32 raças encontradas nesse estudo, as de maior
127 freqüência foram: Poodle (33,4%), Pinscher (14,5%), Dachshund (12,5%), Cocker Spaniel
128 (9,5%) e Pitbull (7,2%). Apesar das cadelas SRD e Poodle terem sido mais acometidas por
129 tumores de mama do que as demais raças (Quadro 1), não houve relação entre raça e tipo de
130 tumor (M ou B) ($p=0,092$), assim como não houve relação entre as variáveis tamanho do
131 tumor e raça ($p=0,281$).

132 A localização do tumor foi relatada em 483/911 protocolos, sendo que 108 (22,36%)
133 descrevia o acometimento de mais de uma glândula mamária. Encontrou-se 18,47%, 31,28%
134 e 50,25% dos tumores, nas glândulas mamárias torácicas (Tr), abdominais (Ab) e inguinais
135 (in), respectivamente, sendo que as glândulas inguinais foram as mais acometidas por tumores
136 malignos ($p<0,05$).

137 O tamanho do tumor foi informado em 682 protocolos histopatológicos, sendo que destes,
138 185 (27,13%) eram T1, 228 (33,43%) eram T2 e 269 (39,44%) eram T3. Observou-se uma
139 prevalência de tumores T3 em animais idosos (43%) ($p=0,015$), bem como uma correlação
140 entre as variáveis localização e tamanho do tumor, ou seja, as mamas inguinais apresentaram
141 com maior freqüência tumores maiores que 5 cm (T3) (113/21; 452,8%) quando comparados
142 com as mamas torácicas (37/214; 17,3%) e abdominais (64/214; 29,9%) ($p= 0,044$) (Tabela
143 1).

144 Apenas 228 laudos informavam a presença (67,1%) ou ausência (32,9%) de ulceração nas
145 lesões de mama. O percentual de ulceração foi elevado tanto nos tumores benignos (57,9%;

146 11/19), quanto nos tumores malignos (68,8%; 137/199), não havendo correlação entre
147 ulceração e tipo de tumor ($p=0,471$). Analisando-se o tamanho dos tumores ulcerados, 13,1%
148 (17/130) eram T1, 31,5% (41/130) T2 e 55,4% (72/130) T3, não sendo demonstrada
149 correlação entre tamanho de tumor e ulceração ($p=0,093$) (Tabela 1).

150 Das 947 lesões de mama classificadas histologicamente, 45 (4,75%) correspondiam à
151 lesões não-neoplásicas, 131 (13,83%) à tumores benignos e 771 (81,42%) à tumores
152 malignos. Dentre os carcinomas, que corresponderam a 88,19% dos tumores malignos, o
153 carcinoma simples (incluindo os sub-tipos “sólido” e “túbulo-papilar”, “tubular” e “papilar”)
154 foi o mais frequente (49,70% - 338/680), seguido pelo carcinoma em tumor misto (25,73% -
155 175/680) e carcinoma complexo (22,64% - 154/680). Foram diagnosticados dois casos de
156 carcinoma inflamatório que, por ser considerado uma síndrome clínica [6], não foi incluído na
157 Tabela 2. A neoplasia benigna mais frequente foi o adenoma simples, seguida do complexo.
158 Quanto às lesões não neoplásicas, as mastites foram as mais freqüentes (Tabela 2).

159

160 DISCUSSÃO

161 A frequência de tumores mamários (32,61%) em relação ao total de diagnósticos
162 histopatológicos analisados neste estudo aproxima-se daqueles relatados em estudos
163 semelhantes que relatam a frequência de tumores mamários entre 36,3 e 49,2% [24]. Mais de
164 40% dos tumores em cadelas estão localizados nas glândulas mamárias [29], ressaltando a
165 importância deste tipo de neoplasia em fêmeas caninas.

166 A freqüência de cães machos com alterações de mama foi baixa, assim como relatado
167 em estudo retrospectivo semelhante, que observou apenas 0,3% de machos com lesões de
168 mama [24]. O risco de ocorrência neste sexo é menor ou igual a 1%, em comparação às
169 fêmeas caninas [27] e os casos geralmente estão associados à ginecomastia [5] induzida por

170 distúrbios hormonais, como tumores das células de sertoli [19]. Neste estudo, as duas lesões
171 mamárias encontradas incluíram um carcinoma em tumor misto e um fibrossarcoma.

172 Os tumores mamários se desenvolvem com maior frequência em cadelas de meia
173 idade e idosas, sendo a maior ocorrência na faixa etária compreendida entre 8 e 10 anos [7,
174 11,23,31,32], corroborando com este estudo, no qual a idade média das cadelas acometidas foi
175 9,99 anos. Alguns autores relatam médias mais baixas para ocorrência de tumores benignos
176 (8,5 anos) [23,24,31]. Porém, no presente estudo, médias muito próximas de idade (9,96 e
177 9,97 anos de idade) de cadelas com tumores benignos e malignos, respectivamente, foram
178 observadas.

179 Geralmente uma maior prevalência de tumores malignos é observada em animais
180 idosos, em comparação aos adultos [23,24,31]. Entretanto, neste estudo, não houve correlação
181 entre as variáveis idade e tipo de tumor, sendo que tanto os animais adultos quanto os idosos
182 apresentaram maior frequência de tumores malignos.

183 Observou-se maior ocorrência de tumores de mama em cadelas SRD em comparação
184 às da raça Poodle neste levantamento. Já em pesquisa realizada na Bahia [33], cadelas da raça
185 Poodle foram mais acometidas do que SRD. As raças encontradas no referido estudo (com
186 exceção da Pitbull) estiveram entre as cinco prevalentes em estudo de 2010 [24]. Alguns
187 autores afirmam não existir predisposição racial para a ocorrência de tumores de mama [8,21],
188 entretanto, um compilado de informações sugere uma predisposição de pelo menos 10 raças,
189 com envolvimento de um componente genético, ainda não identificado [30]. Destas, seis raças
190 foram encontradas neste estudo: Poodle, Cocker Spaniel, Pointer, Maltês, Yorkshire Terrier e
191 Dachshund. Dados de ocorrência de tumores de mama em cadelas de acordo com a raça
192 devem ser avaliados com critério, uma vez que existem diferenças na composição racial das
193 populações caninas nas diferentes regiões do país e do mundo [24,30,33].

194 Sabe-se que a ocorrência de tumores múltiplos, localizados em mais de uma glândula
195 mamária, gira em torno de 50 a 70% [3,19,31,33]. A menor prevalência encontrada neste
196 estudo (21,95%) pode ter refletido a falta de informações completas referentes à localização
197 das lesões.

198 A glândula inguinal foi a mais acometida pelos tumores, conforme relatado pela
199 literatura [6,29,33], sendo que 49,23% dos tumores malignos estavam localizados na referida
200 glândula. A prevalência tumoral na região inguinal tem sido atribuída à maior quantidade de
201 parênquima [19], e à maior abundância de receptores hormonais nessas glândulas [10]. A
202 vascularização fornecida às glândulas abdominais caudais e inguinais pela artéria epigástrica
203 superficial caudal e ramos perivulvares da artéria pudenda externa, também pode ser um fator
204 envolvido [25].

205 O tamanho do tumor é considerado um fator prognóstico, ao passo que aqueles com
206 diâmetro igual ou inferior a 3 cm (T1) estão correlacionados a melhor prognóstico [6,30]. A
207 maior freqüência de tumores com diâmetro superior a 5 cm (T3) neste estudo corrobora com
208 estudos que relataram maior freqüência de T3 e baixa ocorrência de T1 [23,33]. Por outro
209 lado, estudos em diferentes regiões do mundo, como o Japão, relataram maior freqüência de
210 T1: 80,6% [14], 77,6% [15] e 49,4% [24], em relação à T2 e T3. Essa diferença de
211 prevalência em relação ao tamanho do tumor no momento do diagnóstico pode refletir uma
212 variação na preocupação com a remoção dos nódulos mamários por parte dos proprietários.

213 A prevalência de T3 em animais idosos pode estar relacionada à malignidade das
214 lesões, já que tumores podem se tornar malignos com o tempo [16], e lesões maiores que 5
215 cm de diâmetro geralmente são malignas [12]. Já a maior ocorrência de T3 em glândulas
216 inguinais pode ter relação com a abundância de parênquima [19] e/ou receptores hormonais
217 [10] das mesmas, sugerindo uma abordagem mais aprofundada em estudos futuros.

218 Encontrou-se um alto percentual de ulceração envolvendo tanto tumores benignos,
219 quanto malignos. Esses dados podem ter sofrido distorção em função do alto número de
220 protocolos histopatológicos sem essa informação. Estudos apontam a ulceração como
221 indicativo de malignidade do tumor, com porcentagens de tumores malignos variando entre
222 70 a 100%, e baixa ocorrência em tumores benignos [23,24,33].

223 À semelhança do ocorrido neste estudo, dados da literatura remetem à superioridade
224 de tipos histológicos malignos, com prevalência variando entre 68 e 91% [9,17,23,24], em
225 comparação aos tumores benignos e lesões não neoplásicas. Entretanto, existem estudos nos
226 quais as percentagens para neoplasmas malignos foram inferiores a 54% [15,19,27,31].
227 Quando prolongado, o tempo compreendido entre o aparecimento do tumor e a avaliação
228 clínica pode ser determinante na progressão de tumores benignos para malignos [31]. Além
229 disso, o descarte de nódulos mamários pequenos na rotina clínica (muitas vezes não são
230 removidos cirurgicamente e nem enviados aos laboratórios para análise histopatológica)
231 também contribui para o aumento do índice de tumores malignos nas pesquisas [20].

232 Das neoplasias malignas, os carcinomas foram os mais prevalentes, corroborando com
233 a literatura [8,16,20,21]. Destes, o carcinoma simples apresentou maior ocorrência,
234 concordando com os achados de vários estudos [8,16,23,24,31]. O carcinoma em tumor misto,
235 que foi o segundo mais prevalente neste estudo, aparece como tipo histológico predominante
236 (56,7%) em estudo retrospectivo de 2012 [33]. A ocorrência dos sarcomas (11,81%) foi bem
237 inferior à frequência dos carcinomas (88,19%) em relação ao total de tumores malignos,
238 corroborando com a literatura, que aponta uma prevalência de sarcomas mamários menor que
239 13% [29].

240 Neste estudo, os adenomas simples foram mais prevalentes que os complexos, entre os
241 tumores benignos. Estes últimos são reconhecidos como os tumores benignos mais comuns

242 em cadelas [31]. Adenoma [16] e os tumores mistos [33] são relatados como os mais
243 prevalentes entre os tumores benignos.

244 Apesar da importância da classificação histológica em predizer o comportamento
245 biológico do tumor, a diversidade de classificações para lesões neoplásicas da glândula
246 mamária em cadelas tem dificultado a comparação dos resultados entre os autores [3,6,23],
247 ocorrendo uma variação na freqüência demonstrada pelos dados disponíveis na literatura [5].

248

249 CONCLUSÕES

250 As neoplasias mamárias em cadelas refletem alto impacto econômico no Hospital
251 Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia, já que representam em torno de 30% da
252 casuística de atendimento clínico-cirúrgico do local;

253 Durante a avaliação clínica, atenção especial deve ser dispensada às mamas inguinais
254 já que estas foram mais acometidas, principalmente por tumores malignos.

255 A importância epidemiológica da patologia na espécie canina justifica sua utilização
256 como objeto de estudos continuados, considerando-se a ocorrência comum de lesões múltiplas
257 e de comportamento histológico maligno.

258

259 **Funding:** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (Projeto
260 APQ-01816-14).

261

262 **Acknowledgements:** Dr. Matias Pablo Juan Szabó e Dr. Rodrigo Pereira de Queiroz
263 (Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia).

264

265 **Declaration of interest.** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are
 266 responsible for the content and writing of the paper.

267

268

REFERENCES

269 **1 ACTION.** Disponível em: <<http://www.portalaction.com.br>>. [Acessado em 07/2015].

270
 271 **2 Ayres M., Ayres Jr M., Ayres D.L. & Santos A.S. 2007.** BioEstat 5.0: Aplicações
 272 estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá;
 273 Brasília: CNPq. 364 p.

274
 275 **3 Benjamin S.A., Lee A.C. & Saunders W.J. 1999.** Classification and behavior of canine
 276 mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles. *Veterinary*
 277 *Pathology*. 36(5): 423-436.

278
 279 **4 Biase N.G. & Ferreira D.F. 2009.** Comparações múltiplas e testes simultâneos para
 280 parâmetros binomiais de K populações independentes. *Revista Brasileira de Biometria*. 27(3):
 281 301-323.

282
 283 **5 Cassali G.D. 2003.** Patologia da glândula mamária. In: Nascimento E.F. & Santos R.L.
 284 (Eds). *Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara
 285 Koogan, pp.119-133.

286
 287 **6 Cassali G.D., Lavalle G.E., Ferreira E., Estrela-Lima A., De Nardi A.B., Ghever C.,**
 288 **Sobral R.A., Amorim R.L., Oliveira L.O., Sueiro F.A.R., Beserra H.E.O., Bertagnolli**
 289 **A.C., Gamba C.O., Damasceno K.A., Campos C.B., Araújo M.R., Campos L.C.,**
 290 **Monteiro L.N., Nunes F.C., Horta R.S., Reis D.C., Luvizotto M.C.R., Magalhães G.M.,**
 291 **Raposo J.B., Ferreira A.M.R., Tanaka N.M., Grandi F., Ubukata R., Batschinski K.,**
 292 **Terra E.M., Salvador R.C.L., Jark P.C., Delecrodi J.E.R., Nascimento N.A., Silva D.N.,**
 293 **Silva L.P., Ferreira K.C.R.S., Frehse M.S., Di Santis G.W., Silva E.O., Guim T.N., Kerr**
 294 **B., Cintra P.P., Silva F.B.F., Leite J.S., Mello M.F.V., Ferreira M.L.G., Fukumasu H.,**
 295 **Salgado B.S. & Torres R. et al. 2014.** Consensus for the Diagnosis, Prognosis and
 296 Treatment of Canine Mammary Tumors - 2013. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*.
 297 7(2): 38-69.

298
 299 **7 Chang S.C., Chang C.C., Chang T.J. & Wong M.L. 2005.** Prognostic factors associated
 300 with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases
 301 (1998–2002). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 227(10): 1625–1629.

302

303 **8 Daleck C.R., Franceschini P.H., Alessi P.H., Santana A.C. & Martins M.I.M. 1998.**
 304 Aspectos clínico e cirúrgicos do tumor mamário canino. *Ciência Rural*. 28(1): 95-100.

305

- 306 **9 De Nardi A.B., Rodaski S., Sousa R.S., Costa T.A., Macedo T.R., Rodigheri S.M., Rios**
307 **A. & Piekarz C.H. 2002.** Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães,
308 atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal do Paraná. *Archives of Veterinary*
309 *Science.* 7(2): 15-26.
- 310
- 311 **10 Donnay I., Rauis J., Devleeshiuwer N., Wouters-Ballman P., Leclercq G. & Verstegen**
312 **J. 1995.** Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor
313 mammary tissues from dogs. *American Journal of Veterinary Research.* 56(9): 1188-1194.
- 314
- 315 **11 Egenvall A., Bonnett N.B., Öhagen P., Olson P., Hedhammar A. & Von Euler H.**
316 **2005.** Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured
317 female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Preventive Veterinary Medicine.* 69(1-2): 109-
318 127.
- 319
- 320 **12 Ferreira E., Bertagnolli A.C., Cavalcanti M.F., Schmitt F.C. & Cassali G.D. 2009.** The
321 relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and
322 malignant canine mammary tumours. *Veterinary and Comparative Oncology.* 7(4): 230-235.
- 323
- 324 **13 Fighera R.A., Souza T.M., Silva M.C., Brum J.S., Graça D.L., Kimmers G.D.,**
325 **Irigoyen L.F. & Barros C.S.L. 2008.** Causas de morte e razões para eutanásia de cães da
326 Mesorregião do Centro Ocidental Rio-Grandense (1965-2004). *Pesquisa Veterinária*
327 *Brasileira.* 28(4): 223-230.
- 328
- 329 **14 Hashimoto S., Yamamura H., Sato T., Kanayama K. & Sakai T. 2002.** Prevalence of
330 mammary gland tumor of small breed dog in the Tokyo metropolitan area. *Journal of*
331 *Veterinary Epidemiology.* 6(2): 85-91.
- 332
- 333 **15 Itoh T., Uchida K., Ishikawa K., Kushima K., Kushima E., Tamada H., Moritake T.,**
334 **Nakao H. & Shii H. 2005.** Clinicopathological survey of 101 canine mammary gland tumors:
335 Differences between small-breed dogs and others. *Journal of Veterinary Medical Science.*
336 67(3): 345-347.
- 337
- 338 **16 Karayannopoulou M., Kaldrimidou E. & Dessiris A. 1990.** Some epidemiological
339 aspects of canine mammary tumours treatment and prognosis. *European Journal of*
340 *Companion Animal Practice.* 1(1): 41-47.
- 341
- 342 **17 Martins A.M.C.R.P.F., Tamaso E. & Guerra J.L. 2002.** Retrospective review and
343 systematic study of mammary tumors in dogs and characteristics of the extracellular matrix.
344 *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.* 39(1): 38-42.
- 345

- 346 **18 Misdorp W., Else R.W., Hellmen E. 1999.** Definitions and explanatory notes. In: ___.
347 Who histological classification of mammary tumors of the dog and cat. Washington: Armed
348 Forces Institute of Pathology. cap. 3. pp. 18-27.
- 349
- 350 **19 Misdorp W. 2002.** Tumors of the mammary gland. In: Meuten D.J. (Ed.). *Tumors in*
351 *Domestic Animals*. 4 ed. Ames: Iowa State Press, pp.575-606.
- 352
- 353 **20 Morris J.S., Dobson J.M., Bostock D.E. & O'Farrell E. 1998.** Effect of
354 ovariohysterectomy in bitches with mammary neoplasms. *Veterinary Record*. 142(24):656-
355 658.
- 356
- 357 **21 Morrison W.B. 1998.** Canine and feline mammary tumors. In: Morrison, W.B. (Ed).
358 *Cancer in dogs and cats. – medical and surgical management*. Baltimore: Willians &
359 Wilkins, pp. 591-598.
- 360
- 361 **22 Nagata W.B., Perri S.H. V., Eugênio F.R., Laranjeira M.G. & Andrade A.L. 2014.**
362 Perfil epidemiológico da neoplasia mamária canina em Araçatuba: uma abordagem estatística.
363 *Revista Estatística UFOP*. 3(3): 669-673.
- 364 **23 Oliveira L.O., Oliveira R.T., Loretti A.P., Rodrigues R. & Driemeier D. 2003.**
365 Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. *Acta Scientiae Veterinariae*. 31(2):
366 105-110.
- 367
- 368 **24 Oliveira Filho J.C., Kommers G.D., Masuda E.K., Marques B.M.F.P.P., Fighera
369 R.A., Irigoyen L.F. & Barros C.S.L. 2010.** Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários
370 em cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 30(2): 177-185.
- 371
- 372 **25 Pinheiro L.G.P., Moraes M.O., Soares A.H., Lopes A.J.T., Naguér M.A.S., Gondim
373 F.A.L., Brandão C.B., Nascimento D.C.H., Soares J.P.H., Silva, J.M.M. 2003.** Estudo
374 experimental de linfonodo sentinel na mama da cadela com azul patente e Tecnécio Tc99m.
375 *Acta Cirúrgica Brasileira*. 18(6): 545–552.
- 376
- 377 **26 R DEVELOPMENT CORE TEAM. R. 2015.** A language and environment for statistical
378 computing, R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <<http://www.r-project.org>>. [Acessado em 05/2015.]
- 380
- 381 **27 Rutteman G.R., Withrow S.J. & MacEwen E.G. 2001.** Tumors of the mammary gland.
382 In: Withrow S.J. & MacEwen E.G. (Eds). *Small Animal Clinical Oncology*. 3ed. Philadelphia:
383 W.B. Saunders, pp.455-477.
- 384

- 385 **28 Santos I.F.C., Cardoso J.M.M., Oliveira K.C., Laisse C.J.M. & Bessa S.A.T. 2013.**
386 Prevalência de neoplasias diagnosticadas em cães no Hospital Veterinário da
387 Universidade Eduardo Mondlane, Moçambique. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária*
388 e Zootecnia. 65(3): 773-782.
- 389
- 390 **29 Sleenckx N., Rooster H., Veldhuis Kroeze E.J.B., Van Ginneken C. & Van Brantegem**
391 L. 2011. Canine Mammary Tumours, an Overview. *Reproduction in Domestic Animals*.
392 46(6): 1112-1131.
- 393
- 394 **30 Sorenmo K.U. 2003.** Canine mammary gland tumors. *Veterinary Clinics of North*
395 *America: Small Animal. Practice*. 33(3): 573-596.
- 396
- 397 **31 Sorenmo K.U., Kristiansen V.M., Cofone M.A., Shofer F.S., Breen A.M., Langeland**
398 M., Mongil C.M., Grondahl A.M., Teige J. & Goldschmidt M.H. 2009. Canine mammary
399 gland tumors - a histological continuum from benign to malignant; clinical and
400 histopathological evidence. *Veterinary and Comparative Oncology*. 7(3): 162-172.
- 401
- 402 **32 Souza T.M., Fighera R.A., Irigoyen L.F., Barros C.S.L. 2006.** Estudo retrospectivo de
403 761 tumores cutâneos em cães. *Ciência Rural*. 36(2): 555-560.
- 404
- 405 **33 Stratmann N., Failing K., Richter A. & Wehrend A. 2008.** Mammary tumor recurrence
406 in bitches after regional mastectomy. *Veterinary Surgery*. 37(1): 82-86.
- 407
- 408 **34 Toríbio J.M.M., Lima A. E., Filho E.F.M., Ribeiro L. G. R., D'Assis M. J. M. H.,**
409 **Teixeira R. G., Damasceno K. A., Cassali G.D. & Neto J. M. C. 2012.** Caracterização
410 clínica, diagnóstico histopatológico e distribuição geográfica das neoplasias mamárias em
411 cadelas de Salvador, Bahia. *Revista Ceres*. 59(4): 427-433.
- 412
- 413 **35 Withrow S.J. 1992.** Biopsy principles. In: *XVII WSAVA*. World Congress (Roma, Itália).
414 p.1221-1226.
- 415
- 416
- 417
- 418
- 419 **Quadro 1:** Frequência (N) e Porcentagem (%) de tumores Benignos (B) e Malignos (M) nas
420 11 principais raças acometidas por tumores mamários em estudo retrospectivo de 728 laudos
421 histopatológicos compreendidos entre 2004-2014.

Raça	Benigno (B)		Maligno (M)		Total	
	N	%	N	%	N	%
Sem Raça Definida	35	12,1	253	87,9	288 ^{a*}	100
Poodle	24	16,3	123	83,7	147 ^b	100
Pinscher	14	21,9	50	78,1	64 ^c	100
Dachshund	08	14,5	47	85,5	55 ^c	100
Cocker Spaniel	10	23,8	32	76,2	42 ^c	100
Pitbull	01	3,1	31	96,9	32 ^c	100
Pastor Alemão	02	8,0	23	92,0	25 ^c	100
Basset Hound	05	22,7	17	77,3	22 ^c	100
Rottweiler	01	4,8	20	95,2	21 ^c	100
Yorkshire terrier	02	11,8	15	88,2	17 ^c	100
Boxer	04	26,7	11	73,3	15 ^c	100

422

*Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p<0,05$)

423

424 **Tabela 1:** Tipo e tamanho de tumores mamários de cadelas de acordo com a idade, localização e presença ou não de ulceração, a partir de protocolos histopatológicos do
 425 Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia - 2004 -2014.

	Variável

Tipo de Tumor	Idade			Localização				Ulceração		
	A	I	Total	Tr	Ab	In	Total	s	n	Total
B	34	81	115	14	19	44	77	11	8	19
M	205	466	671	97	169	258	524	137	62	199
Total	239	547		111	188	302		148	70	

Tamanho do tumor	A	I	Total	Tr	Ab	In	Total	s	n	Total
T1	58	106	164	30	60	62	152	17	14	31
T2	63	146	209	33	45	99	177	41	21	62
T3	60	168	228	37	64	113	214	72	24	96
Total	181	420		100	169	274		130	59	

427 B – tumores benignos; M – tumores malignos

428 T1 – tumores <que 3 cm; T2 – tumores entre 3 e 5 cm; T3 – tumores maiores que 5 cm

429 **Tabela 2:** Tipos histológicos de tumores mamários e lesões não neoplásicas de mama de

430 amostras do acervo de protocolos histopatológicos do Laboratório de Patologia Veterinária da

431 Universidade Federal de Uberlândia - 2004-2014.

<i>Tipo histológico</i>	<i>Freqüência (n)</i>	<i>Percentual</i>	<i>Percentual Total</i>
		<i>Grupo (%)</i>	<i>de Lesões (%)</i>

BENIGNAS			
Adenoma Simples	63	48,09	6,65
Adenoma Complexo	17	12,98	1,80
Tumor Misto Benigno	34	25,95	3,59
Fibroadenoma	17	12,98	1,79
TOTAL	131	100,00	13,83
MALIGNAS			
Carcinomas			
Carcinoma Complexo	154	22,81	16,27
Carcinoma Sólido	116	17,18	12,25
Carcinoma em Tumor Misto	175	25,92	18,48
Carcinoma Tubular	126	18,67	13,30
Carcinoma Papilar	48	7,12	5,07
Carcinoma Tubulopapilar	48	7,12	5,07
Carcinoma <i>in situ</i>	8	1,18	0,84
TOTAL	675	100,00	71,28

Tipos especiais de carcinoma			
Carcinoma Micropapilar	3	60,00	0,32
Carcinoma inflamatório	2	40,00	0,21
TOTAL	5	100,00	0,53
Sarcomas			
Hemangioссарcoma	32	35,17	3,38
Fibrossarcoma	22	24,17	2,32
Carcinossarcoma	14	15,38	1,48
Lipossarcoma	8	8,79	0,84
Osteossarcoma	12	13,19	1,27
Condrossarcoma	3	3,30	0,32
TOTAL	91	100,00	9,61
LESÕES NÃO NEOPLÁSICAS			
Mastite	32	71,11	3,38
Hiperplasia	12	26,67	1,27
Cistos Mamários	1	2,22	0,10
TOTAL	45	100,00	4,75

TOTAL GERAL	947	100,00
-------------	-----	--------

432

433

434

435

436

437

438

439

440

441

442

443

444

445

**CAPÍTULO 3 - Fatores de Prognóstico em Carcinomas Mamários Caninos e sua
Relação com Expressão de HER-2**

Prognostic Factors in Canine Mammary Carcinomas and HER-2 Expression Relationship

(Artigo a ser submetido no periódico **Acta Scientiae Veterinariae**)

1 **Fatores de Prognóstico em Carcinomas Mamários Caninos e sua Relação com**
2 **Expressão de HER-2**

3 Prognostic Factors in Canine Mammary Carcinomas and HER-2 Expression Relationship

4

5 **Nicolle Pereira Soares¹, Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi¹, Igor de Paula Castro¹,**
6 **Taís Meziara Wilson¹, Thaís de Almeida Moreira¹ & Mariana Batista Andrade**

7 ¹Laboratório de Patologia Animal, Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV),
8 Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas Gerais, MG, Brasil.

9 CORRESPONDENCE: N.P. Soares [nicolle.pereira@hotmail.com – Tel +55 (34)3291-8432].
10 Laboratório de Patologia Animal, Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV), Programa de
11 pós graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Uberlândia – UFU, Rua
12 Ceará, s/n, Bloco 2D, Campus Umuarama, Bairro Umuarama, CEP: 39408-902, Uberlândia,
13 Minas Gerais, MG, Brasil.

14

15

16 **ABSTRACT**

17 **Background:** The human epidermal growth factor type 2 (HER-2) receptor is a membrane
18 glycoprotein tyrosine kinase. In woman, HER-2 expression is diagnosed in 30% of breast
19 carcinomas and it is associated with a worse prognosis, higher rate of recurrence and
20 mortality. In the bitch, the HER-2 overexpression in canine mammary tumors is still
21 controversial and the prognostic value remains uncertain. Thus, we aimed to verify the HER-2
22 expression in canine mammary carcinomas and relate it to the type and histological grade,
23 lymph node metastasis and clinical staging.

24 **Materials, Methods & Results:** Ninety bitches diagnosed with mammary carcinoma were
25 included in this study. The inclusion criteria were bitches with complete clinical examination,
26 thoracic radiographic examination and submitted unilateral or bilateral mastectomy. Ninety-
27 nine samples of mammary carcinoma were used and the fragments of tumor and regional
28 lymph nodes were fixed in 10% neutral formalin for histopathological and

29 immunohistochemistry analysis. The lesions were evaluated by two pathologists and
30 classified according to the type and histological grade. HER-2 expression was performed by
31 semi-quantitative analysis of the slides according to the HerceptTestTM (Dako)
32 recommended score. Simple carcinomas were the most frequent (51.51%) followed by
33 complex carcinomas (46.47%) and *in situ* carcinoma (2.02%). The histological grade of 97
34 carcinoma samples was attributed, except *in situ* carcinoma, 37 (38.14%) of the neoplasms
35 were grade I, 50 (51.55%) grade II and only 10 (10.31%) tumors were classified as grade III.
36 Forty bitches were submitted to clinical staging (TNM) and 42.50% of the bitches received
37 staging in grade I and, 25% of the bitches staged in grade IV and V, with metastases. The
38 HER-2 expression, 13/99 samples (13.13%) received score +2, 19/99 (19.19%) score +1 and
39 absence of marking (score 0) was identified in 67 samples (67.80 %). Immunostaining in
40 hyperplastic or normal epithelial cells was evidenced, often in association with weak or
41 moderate cytoplasmic labeling. Of the samples expressing +2 score for HER-2 (n = 13), eight
42 samples (17.39%) were complex carcinoma and five (9.80%) simple carcinomas. There was
43 no relationship between HER-2 immunostaining with age, tumor size, TNM, histological
44 type, histological gradation, lymph node metastasis and distance. Animals with lymph node
45 metastasis, as well as those diagnosed with distant metastasis, did not present HER-2
46 expression in the tumors.

47 **Discussion:** The simple carcinoma seems to be the most frequent type histological diagnosed
48 in canine mammary carcinomas, followed by carcinoma in mixed tumor and complex
49 carcinoma. Tubulopapillary carcinomas are more invasive in the female dogs as well as in the
50 woman. Carcinomas grade I and II are more frequent and present a better prognosis for the
51 dog. However, bitches with grade III carcinoma survived for a shorter time when compared to
52 dogs with grade I or II tumors. A factor that may have contributed to the lower number of
53 bitches at worst prognostic stage (EC IV and V) is the current owners' awareness that they

54 have sought veterinary help earlier, as soon as they detect small nodules in mammary gland.
55 Overexpression of HER-2 in women breast cancer is diagnosed in 20-30% of cases, whereas
56 in bitches, this expression is variable. And the different percentages of canine HER-2
57 immunostaining are due to the lack of standardization for the analysis of the immunostaining,
58 the immunohistochemical techniques employed and the non-specificity of the HER-2
59 antibody. In canine mammary carcinomas the HER-2 expression is low and this
60 immunostaining is not related to other established prognostic factors. This study reinforces
61 the hypothesis put forward by other authors that in the bitch the expression of HER-2 may not
62 be related to malignancy and tumor progression.

63

64 **Keywords:** dog, human epidermal growth factor receptor, mammary tumours,
65 immunohistochemistry

66

67 INTRODUÇÃO

68 Os tumores mamários são as neoplasias mais comuns em cadelas [27] sendo que mais
69 de 75% dos casos são considerados malignos [5,20]. As neoplasias de mama de cadelas
70 constituem um grupo heterogêneo de tumores quanto aos padrões histológicos e
71 comportamento biológico [25,33] o que torna mais complexo e urgente a identificação de
72 fatores de prognóstico e preditivos [24] que possibilitem diagnosticar e tratar de forma mais
73 eficaz animais portadores de tumor de mama [28].

74 O receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (Human Epidermal
75 Growth Factor Receptor type 2 – HER-2) é uma glicoproteína de membrana da família
76 tirosina-quinase, codificada por um gene de mesmo nome [15]. Na mulher, a expressão de
77 HER-2 em câncer de mama é diagnosticada em 20 a 30% dos carcinomas de mama [11] e está
78 associado a um pior prognóstico, maior taxa de recorrência e mortalidade [36].

79 Na cadeia, a superexpressão de HER-2 em tumores mamários caninos (TMC) ainda é
80 controversa [4,22]. Estudos prévios que investigaram o papel do HER-2 nos TMC com
81 emprego da imunohistoquímica não são consensuais, com resultados de imunoexpressão em
82 tumores malignos variando de 19,1 a 48% [6,12,15,29,31]. Além disso, seu valor prognóstico
83 permanece incerto [6,8,11,15,26].

84 Apesar do HER-2 ser importante biomarcador terapêutico e de prognóstico do câncer
85 de mama em mulheres, sua relevância ainda não é bem estabelecida em tumores mamários de
86 cadelas [4]. Dessa forma, objetivou-se verificar a expressão de HER-2 em carcinomas
87 mamários de cadelas e relacioná-la com o tipo e grau histológico, idade das cadelas, metástase
88 em linfonodos e à distância, tamanho tumoral e estadiamento clínico.

90 MATERIAIS E MÉTODOS

91 Foram incluídas neste estudo 99 amostras de mama provenientes de 90 cadelas
92 diagnosticadas com carcinoma no Hospital Veterinário da Universidade Federal de
93 Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. Os critérios de inclusão foram: cadelas com exame clínico
94 detalhado, exame radiográfico de tórax para pesquisa de metástase pulmonar e que foram
95 submetidas ao tratamento cirúrgico de exérese de tumor de mama (mastectomia unilateral ou
96 bilateral total). Foram excluídas do estudo cadelas com histórico de uso de fármacos que
97 pudessem interferir com o desenvolvimento tumoral (drogas anti neoplásicas, anti-
98 inflamatórios).

99 O estadiamento clínico (TNM) foi realizado conforme a Organização Mundial da
100 Saúde (OMS) [21,35]. Os fragmentos de cada tumor mamário e de linfonodos regionais
101 retirados cirurgicamente, foram fixados em formol tamponado 10%, submetidos ao
102 processamento histológico para confecção de lâminas de microscopia coradas em
103 hematoxilina e eosina (HE). A avaliação histológica foi atribuída por dois patologistas e as

104 neoplasias mamárias foram classificadas de acordo com os tipos histológicos [17] e graduação
105 histológica [7].

106 As amostras de carcinomas mamários foram submetidas à imunohistoquímica [12,3].
107 A recuperação antigênica por calor foi realizada em micro-ondas na potência alta (720 W) por
108 15 min em solução ácido etilenodiamino tetra-acético dissódico (EDTA) 10 mM, pH 9. Em
109 seguida, as lâminas foram resfriadas em água corrente por 20 min. Para o bloqueio de
110 peroxidase endógena utilizou-se água oxigenada 10 V, 10 banhos de três minutos cada.

111 O anticorpo anti HER-2 monoclonal¹ foi diluído 1:400 em soro albumina bovina
112 (BSA) 1%. Os cortes receberam 100 µl do anticorpo e foram incubados por 18 h, 4°C em
113 câmara úmida. Após incubação as lâminas foram lavadas com solução TRIS tampão (2-
114 Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol) e utilizou-se a técnica de estreptavidina-biotina-
115 peroxidase². A reação foi revelada com diaminobenzina³, as lâminas foram contra coradas
116 com Hematoxilina de Harris por 2 min e montadas.

117 Como controle positivo da reação, utilizou-se corte histológico de carcinoma mamário
118 de mulher previamente testado para expressão de HER-2 e com escore +3 [2]. Como controle
119 negativo, substitui-se o anticorpo primário pelo diluente do anticorpo (BSA 1%).

120 A expressão de HER-2 foi determinada por análise semi quantitativa, realizada a partir
121 da verificação da marcação da membrana das células epiteliais, conforme escore
122 recomendado pelo HerceptTestTM (Dako). O escore +3 foi atribuído no caso de
123 imunomarcação intensa, uniforme e completa de membrana plasmática em mais de 80% das
124 células epiteliais da amostra tumoral. No escore +2 observou-se imunomarcação completa ou
125 incompleta de membrana, em mais de 10% de células epiteliais neoplásicas. O escore +1 foi
126 atribuído no caso de marcação fraca e incompleta de membrana plasmática, em pelo menos
127 10% de células epiteliais, e o escore 0 quando não houve marcação de membrana plasmática.
128 As imunomarcações de secreções luminal, em epitélio normal e acúmulos extracelulares na

129 amostra do tecido foram desconsideradas. Os tumores com escore +3 e +2 foram considerados
130 positivos.

131 Relacionou-se estatisticamente a expressão de HER-2 com o tipo histológico do tumor
132 mamário, sendo que os carcinomas foram agrupados em simples (tubulopapilar, sólido e
133 anaplásico) e complexos. Avaliou-se também a relação da expressão de HER-2 e a idade, o
134 estadiamento clínico, o grau histológico, o tamanho tumoral, metástase regional e metástase à
135 distância.

136 Quanto à análise estatística, a relação entre expressão de HER-2 e tipo de carcinoma
137 (simples e complexo) e os tipos individuais de carcinomas mamários foi determinada pelo
138 teste Qui-quadrado (χ^2) por meio do programa Action 2.5 em Microsoft Excel 2007. Ainda,
139 utilizou-se o teste Qui quadrado ($P<0,05$) para avaliar a relação entre tipos de carcinomas
140 com o estadiamento clínico, grau de malignidade, tamanho tumoral e metástase regional com
141 o escore de marcação na IHQ. Por fim, utilizou-se o teste de Mann Whitney para verificar a
142 relação entre a grau histológico dos carcinomas e o escore de marcação por HER-2 ($P<0,05$).

143

144 **RESULTADOS**

145 A idade das 90 cadelas com tumores mamários variou de quatro a 17 anos, com média
146 de $10,03 \pm 2,84$ anos. A maior distribuição dos pacientes foi entre oito e 13 anos.

147 Das 99 amostras de carcinomas mamários de cadelas, 51 (51,51%) foram
148 diagnosticadas como carcinoma simples, 46 (46,47%) como carcinoma complexo (Figura 1A)
149 e duas (2,02%) carcinoma *in situ*. Quanto aos tipos histológicos, o carcinoma tubulopapilar
150 (Figura 1B) foi o tipo mais frequente de carcinoma simples, diagnosticado em 74,50% das
151 amostras, seguido do carcinoma sólido (23,54%) e o anaplásico (1,96 %) (Tabela 1).

152 O grau histológico foi atribuído a 97 (97,98%) amostras de carcinomas, exceto o
153 carcinoma *in situ* (n=2), sendo que 37 (38,14%) das neoplasias eram de grau I, 50 (51,55%)
154 grau II e apenas 10 (10,31%) tumores foram classificados como grau III (Tabela 1).

155 Das 90 cadelas avaliadas, 40 (44,44%) tiveram linfonodos inguinais, ipsilaterais à
156 neoplasia mamária, retirados cirurgicamente. Verificou-se a presença de metástases em oito
157 linfonodos (20%) e 32 (80%) não apresentaram metástase em linfonodo inguinal.

158 A partir da avaliação da presença de metástases em linfonodos, estas 40 cadelas foram
159 submetidas ao estadiamento clínico (TNM), sendo que 17 (42,50%) apresentaram
160 estadiamento clínico (EC) I, nove animais (22,50%) EC II, quatro cadelas (10%) EC III, cinco
161 (12,50%) EC IV e cinco (12,50%) EC V (Tabela 2).

162 Quanto à expressão de HER-2, 13/99 amostras (13,13%) receberam escore +2, 19/99
163 (19,19%) escore +1 e ausência de marcação (escore 0) foi identificada em 67 amostras
164 (67,80%). Nenhuma amostra de neoplasia mamária apresentou imunomarcação +3 para HER-
165 2. Quanto aos tipos histológicos que expressaram HER-2, 8/46 (17,39%) amostras eram
166 carcinoma complexo (Figura 1C) e 5/51 (9,80%) carcinomas simples, sendo que, apenas os
167 carcinomas tubulopapilares expressaram HER-2 (Figura 1D). Imunomarcação de membrana
168 de células epiteliais hiperplásicas ou normais foram evidenciadas, muitas vezes em associação
169 com fraca ou moderada marcação citoplasmática. Nenhuma imunomarcação foi observada no
170 componente mesenquimal, representado pelas células mioepiteliais contráteis, fibroblastos ou
171 tecido conjuntivo.

172 Relacionou-se expressão de HER-2 e com os fatores prognósticos: idade, tipo
173 histológico, grau histológico, tamanho do tumor, presença de metástase em linfonodos e a
174 distância e estadiamento clínico; sendo que não houve relação positiva entre a expressão de
175 HER-2 e os fatores prognósticos estudados (Tabela 2).

176

177

DISCUSSÃO

178 No presente trabalho, carcinomas simples, dentre eles, o carcinoma tubulopapilar,
179 foram os tipos histológicos mais frequentes. Estudos prévios também relataram o carcinoma
180 simples como o mais frequente, seguido do carcinoma em tumor misto e carcinoma complexo
181 [26,30]. Na cadela, assim como na mulher, os carcinomas tubulares são mais invasores,
182 enquanto que o carcinoma *in situ* e o carcinoma complexo tem os melhores prognósticos [18].

183 Quanto à graduação histológica, atribuída a 97 amostras de carcinomas mamários deste
184 estudo, 51,55% das neoplasias eram grau II. Carcinomas em grau I e II são mais frequentes
185 [22] e apresentam melhor prognóstico para a cadela [22] e cães com carcinoma grau III
186 sobreviveram por tempo menor quando comparados com cães portadores de tumores grau I ou
187 II [13].

188 Neste estudo, os carcinomas simples do tipo sólido apresentaram maior número de
189 amostras com grau III. Estudos prévios [13] verificaram que cães com carcinomas simples
190 apresentam pior prognóstico quando comparados com outros carcinomas, porém não
191 verificaram diferença na sobrevida quando estes carcinomas apresentavam grau II ou III,
192 ambos de pior prognóstico. Outros trabalhos demonstraram que carcinomas complexos, de
193 grau I e II são mais frequentes e os cães com este tipo de carcinoma apresentavam bom
194 prognóstico [13,32].

195 As cadelas deste relato, as quais os linfonodos foram avaliados, 20% dos linfonodos
196 estavam comprometidos com metástases. Estes resultados são semelhantes a estudos
197 anteriores, em que 29,5% das cadelas apresentaram envolvimento nodal [20]. A presença de
198 metástases em linfonodos regionais influencia sobremaneira a sobrevida, com redução
199 significativa da expectativa de sobrevivência de cadelas com carcinomas mamários, quando
200 comparadas às cadelas sem metástase linfonodal [32].

201 Dentre os diversos fatores prognósticos em tumores mamários caninos estão o
202 tamanho tumoral, a condição dos linfonodos e o estadiamento do paciente [14]. No presente
203 estudo, a maioria das cadelas recebeu estadiamento no grau I (42,50%), ou seja, possuíam
204 tumores menores que três centímetros e sem metástases em linfonodo regional ou à distância;
205 e 25% foram estadiadas em grau IV e V, ou seja, com metástases. Estudos anteriores
206 avaliaram estadiamento clínico de cadelas com carcinomas mamários e identificaram 27,7%
207 das cadelas na classificação TNM grau I e 36,6% no grau II [34].

208 Um fator que pode ter contribuído para o menor número de cadelas em estádios com
209 pior prognóstico (EC IV e V) é a atual conscientização dos proprietários, que tem procurado
210 por auxílio médico veterinário mais precocemente, assim que detectam pequenos nódulos na
211 mama, como relatado em outros países [16,37].

212 Quanto à imunomarcação de HER-2 nas amostras de mama de cadelas do presente
213 trabalho, 13,13% das mamas neoplásicas foram positivas conforme o escore +2. Nos
214 carcinomas mamários de cadelas, o escore +2 para HER-2 parece ser frequente, diagnosticado
215 em 17,6% [15], 22% [26] e 91% [6] dos carcinomas.

216 Há divergência na interpretação da expressão de HER-2 proposta pelo HercepTestTM e
217 a Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) [36] assim como, o Consenso e
218 Diretrizes para padronização da identificação do HER-2 em tumores mamários de cadelas
219 [23]; os quais consideram HER-2 positivas apenas as amostras de carcinomas mamários com
220 escore +3. Porém, grande parte dos estudos sobre expressão de HER-2 em tumores mamários
221 de cadelas utiliza o sistema clássico de escore utilizado em câncer de mama humano,
222 HercepTestTM [12,15,26].

223 A superexpressão de HER-2 em câncer de mama em mulheres é diagnosticada em 20-
224 30% dos casos (9), enquanto que nas cadelas, essa expressão é variável (13,6 a 48%)
225 [2,12,15,29]. Na cadela, as variações nos percentuais de imunomarcação para HER-2 deve-se

226 à ausência de padronização para análise das imunomarcações e técnicas imunohistoquímicas
227 empregadas [4,19].

228 Ou ainda, outro fator a ser avaliado é que na detecção da expressão de HER-2 por
229 métodos imunohistoquímicos, utiliza-se anticorpo anti-HER-2 humano. Estudos anteriores
230 confirmaram a reatividade cruzada entre os anticorpos contra proteínas anti-humanas e
231 tecidos caninos [11,15,29]. Contudo a ausência de imunomarcação ou ainda, marcação de
232 intensidade variável em carcinomas mamários de cadelas, assim como, a presença de
233 marcações inespecíficas identificadas no citoplasma celular ou imunomarcação de células
234 hiperplásicas ou normais dentro da amostra tumoral, sugerem a inespecificidade do anticorpo
235 [4].

236 As neoplasias mamárias acometem principalmente cadelas adultas e idosas, com baixa
237 incidência em animais menores que dois anos [18]. As médias de idade relatadas na literatura
238 são 10,17 [34], 10,2 [27] e 10,6 [10], semelhantes à média observada nas cadelas desse
239 estudo. Assim como na mulher, idade é considerada como um fator de risco para neoplasias
240 mamárias em cadelas, sendo já verificado que a média de idade dos animais com tumores
241 benignos era inferior a média dos animais com tumores malignos [33].

242 A ausência de relação entre o escore marcação de HER-2 e o idade dos animais
243 observada no presente estudo já foi relatado [11,26]. Por outro lado, há estudos que indicam
244 maior expressão de HER-2 em animais com idade superior a 9 anos [8]. Ainda, a partir do
245 ponto de vista biológico, cães com 10 anos de idade correspondem a 56-60 anos em humanos
246 [25], ou seja, a maior incidência de carcinomas mamários ocorre em cães idosos com idade de
247 7-10 anos, correspondente a 44-56 anos em humanos. Sendo assim, os picos de incidência de
248 tumores de mama em cadelas do presente trabalho e em mulheres são semelhantes,
249 reafirmando a idade como fator de risco.

250 Estudos prévios com HER-2 em tumores mamários de cadelas assim como no presente
251 trabalho, não verificaram correlação entre tipo histológico e a imunomarcação de HER-2 nos
252 carcinomas mamários mistos [2,11]. Neoplasias mamárias de cadelas são consideradas
253 heterogêneas quanto ao comportamento biológico e morfológico [33] e a imunomarcação de
254 HER-2 depende da sensibilidade do método de detecção molecular e da expressão gênica
255 [10]. Acredita-se que na cadelas, diferentemente na mulher, o HER-2 desempenha função na
256 formação tumoral, mas o desenvolvimento tumoral pode não estar diretamente associado à
257 imunoexpressão de HER-2 [11].

258 A graduação histológica, juntamente com a imunomarcação de HER-2 em tumores
259 mamários de cadelas, são consideradas fatores de prognóstico [12], entretanto neste estudo
260 não foi observada relação entre estes dois fatores de prognóstico, assim como relatado em
261 estudos anteriores [11].

262 Na cadelas e na mulher, o tamanho também é, isoladamente, fator de prognóstico.
263 Entretanto, no presente estudo não houve relação entre o escore de marcação de HER-2 e o
264 tamanho tumoral, assim como relatado anteriormente [11,1]. Na mulher, fatores como a
265 existência ou a falta de receptores hormonais, diferentes tipos de receptores de crescimento
266 epidérmico e genes supressores de tumor podem influenciar o tamanho tumoral [8,9].
267 Acredita-se que fenômenos semelhantes possam ocorrer nas cadelas em relação ao tamanho
268 tumoral [1].

269 No câncer de mama em mulheres há controvérsias sobre a relação metástase em
270 linfonodos e expressão de HER-2 [22]. O mesmo parece ocorrer em cadelas, onde há estudos
271 que indicam que a expressão de HER-2 em animais com metástase linfonodal varia de
272 22,86% a 40% [10] e, por outro lado, outros estudos não verificaram relação positiva entre a
273 expressão de HER-2 e o envolvimento linfonodal [11,26].

274 Não houve relação entre a imunomarcação de HER-2 e a presença de metástase à
275 distância, assim como relatado em estudo anterior [11]. Estes autores [11] analisaram o
276 tempo de vida das cadelas, um ano após a cirurgia de mastectomia, e verificaram que aquelas
277 cadelas com metástase à distância, mesmo sem a expressão HER-2 apresentaram menor
278 tempo de sobrevida.

279

280 CONCLUSÃO

281 A imunomarcação de HER-2 em carcinomas mamários de cadelas é baixa e não
282 apresenta relação com fatores de prognóstico como tamanho tumoral, tipo e graduação
283 histológica, TNM, envolvimento nodal e metástases à distância. Este estudo reforça a hipótese
284 aventada por outros autores de que na cadelas a expressão de HER-2 pode não estar
285 relacionada com a malignidade e progressão tumoral.

286

287 SOURCES AND MANUFACTURERS

288 ¹Anticorpo anti HER2 monoclonal SP3- SAB5500080- Sigma- Aldrich, St. Louis, Missouri,
289 EUA.

290 ²Complexo estreptavidina-peroxidase - DAKO, K069011 - LSAB + HRP (rabbit/mouse/goat),
291 Carpinteria, California, EUA.

292 ³Diaminobenzina - DAKO- K3468, DAB, Carpinteria, California, EUA.

293 **Acknowledgements.** We would like to thank Uberlândia Federal University (UFU) and PhD
294 Ignez Candelori (Human Pathology Laboratory - Clinic Hospital - UFU).

295 **Funding.** This research was supported by Uberlândia Federal University, Conselho Nacional
296 de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and FAPEMIG .

297 **Ethical Approval.** O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de ética da
 298 Universidade Federal de Uberlândia (UFU) conforme o processo CEUA/UFU 082/14.

299 **Declaration of interest.** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are
 300 responsible for the content and writing of the paper.

301

302 **REFERÊNCIAS**

303 **1 Almasri N.M. & Al Hamad M. 2005.** Immunohistochemical evaluation of human
 304 epidermal growth factor receptor 2 and estrogen and progesterone receptors in breast
 305 carcinoma in Jordan. *Breast Cancer Research*. 7(5): 598-604.

306 **2 Bertagnolli A.C., Ferreira E., Dias E.J. & Cassali. G.D. 2011.** Canine mammary mixed
 307 tumours: immunohistochemical expressions of EGFR and HER-2. *Australian Veterinary
 308 Journal*. 89(8): 312-317.

309 **3 Beselga A.G. 2013.** Avaliação da expressão do recetor HER-2 em carcinomas mamários
 310 caninos. 91f. Lisboa. Dissertação (Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina
 311 Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa.

312 **4 Burrai G.P., Tanca A., De Miglio M.R., Abbondio M., Pisanu S., Polinas M., Pirino S.,
 313 Mohammed S.I., Uzzau S., Addis M.F. & Antuofermo E. 2015.** Investigation of HER2
 314 expression in canine mammary tumors by antibody-based, transcriptomic and mass
 315 spectrometry analysis: is the dog a suitable animal model for human breast cancer? *Tumour
 316 Biology*. 36(11): 9083-9091.

317 **5 Cassali G.D., Lavalle G.E., Ferreira E., Estrela-Lima A., de Nardi A.B., Ghever C.,
 318 Sobral R.A., Amorim R.L., Oliveira L.O., Sueiro F.A.R., Beserra H.E.O., Bertagnolli
 319 A.C., Gamba C.O., Damasceno K.A., Campos C.B., Araujo M.R., Campos L.C.,
 320 Monteiro L.N., Nunes F.C., Horta R.S., Reis D.C., Luvizotto M.C.R., Magalhães G.M.,
 321 Raposo J.B., Ferreira A.M.R., Tanaka N.M., Grandi F., Ubukata R., Bastchinski K.,
 322 Terra E.M., Salvador R.C.L., Jark P.C., Delecrodi J.D.R., Nascimento N.A., Silva D.N.,
 323 Silva L.P., Ferreira K.C.R.S., Frehse M.S., di Santis G.W., Silva E.O., Guim T.N., Kerr
 324 B., Cintra P.P., Silva F.B.F., Leite J.S., Mello M.F.V., Ferreira M.L.G., Fukumasu H.,
 325 Salgado B.S. & Torres R. 2014.** Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of
 326 canine mammary tumors - 2013. *Brazilian Journal Veterinary Pathology*. 7(2): 38-69.

327 **6 Dutra A.P., Granja N.V.M., Schmitt F.C. & Cassali G.D. 2004.** c-erbB-2 expression and
 328 nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. *Brazilian Journal Medical Biology
 329 Research*. 37(11): 1673-81.

330 **7 Elston C.W. & Ellis I.O. 1991.** Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The
 331 value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term
 332 follow-up. *Histopathology*. 19(5): 403-410.

- 333 **8 Gama A., Paredes J., Gärtner F., Alves A. & Schmitt F. 2008.** Expression of E-cadherin,
 334 P-cadherin and beta-catenin in canine malignant mammary tumours in relation to
 335 clinicopathological parameters, proliferation and survival. *Veterinary Journal*. 177(1): 45-53.
- 336 **9 Goldhirsch A., Wood W.C., Coates A.S., Gelber R.D., Thürlimann B. & Senn H-J.**
 337 2011. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St
 338 Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *Annals of*
 339 *Oncology*. 22(8): 1736-1747.
- 340 **10 Guimarães M.J.G. 2012.** Pesquisa da Interação entre a Expressão do EGFR e da COX-2
 341 nos tumores de mama de cadelas. 71f. Alto Douro. Dissertação (Dissertação de Mestrado em
 342 Oncologia) - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto.
- 343 **11 Hsu W.L., Huang H.M., Liao J.W., Wong M.L. & Chang S.C. 2009.** Increased survival
 344 in dogs with malignant mammary tumours overexpressing HER-2 protein and detection of a
 345 silent single nucleotide polymorphism in the canine HER-2 gene. *Veterinary Journal*. 180(1):
 346 116-123.
- 347 **12 Im K.S., Kim N.H., Lim H.Y., Kim H.W., Shin J.I. & Sur JH. 2014.** Analysis of a new
 348 histological and molecular-based classification of canine mammary neoplasia. *Veterinary*
 349 *Pathology*. 51(3): 549-559.
- 350 **13 Karayannopoulou M., Kaldrymidou E., Constantinidis T.C. & Dessiris A. 2005.**
 351 Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a
 352 human grading method. *Journal of Comparative Pathology*. 133(4): 246-252.
- 353 **14 Lavalle G.E., Bertagnolli A.C., Tavares W.L.F. & Cassali G.D. 2009.** Cox-2 expression
 354 in canine mammary carcinomas correlation with angiogenesis and overall survival. *Veterinary*
 355 *Pathology*. 46(6): 1275-1280.
- 356 **15 Martin de las Mulas J., Ordás J., Millán Y., Fernández-Soria V. & Ramón y Cajal S.**
 357 2003. Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas: an immunohistochemical and
 358 chromogenic in situ hybridization study. *Breast Cancer Research and Treatment*. 80(3): 363-
 359 367.
- 360 **16 Millanta F., Calandrella M., Bari G., Niccolini M., Vannozzi I. & Poli A. 2005.**
 361 Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and
 362 feline mammary tissues. *Research in Veterinary Science*. 79(3): 225-232.
- 363 **17 Misdorp W., Else R.W., Hellmen E. & Lipscomb TP. 1999.** In: *Histological*
 364 *Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat*. 2.ed. Washington: Armed Forces
 365 Institute of Pathology, pp.1-59.
- 366 **18 Misdorp W. 2002.** Tumors of the Mammary Gland. In: Misdorp W. *Tumors in Domestic*
 367 *Animals*. Iowa: Iowa State Press, pp.576-606.
- 368 **19 Muhammadnejad A., Keyhani E., Mortazavi P., Behjati F. & Haghdoost I.S. 2012.**
 369 Overexpression of her-2/neu in malignant mammary tumors; translation of clinicopathological
 370 features from dog to human. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 13(12): 6415-6421.

- 371 **20 Oliveira Filho J.C., Kommers G.D., Masuda E.K., Marques B.M.F.P.P., Fighera**
 372 **R.A., Irigoyen L.F. & Barros C.S.L. 2010.** Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários
 373 em cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 30(2): 177-185.
- 374 **21 Owen L.N. 1980.** *TNM Classification of Tumours in Domestic Animal*. Geneva: World
 375 Health Organization, 53p.
- 376 **22 Peña L., De Andrés P.J., Clemente M., Cuesta P. & Pérez-Alenza M.D. 2013.**
 377 Prognostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in
 378 a prospective study with two-year follow-up: relationship with clinical and histological
 379 characteristics. *Veterinary Pathology*. 50(1): 94-105.
- 380 **23 Peña L., Gama A., Goldschmidt M.H., Abadie J. Benazzi C., Castagnaro M., Díez L.,**
 381 **Güartner F., Hellmén E., Kiupel M., Millán Y., Miller M.A., Nguyen F., Poli A., Sarli G.,**
 382 **Zappulli V. & Martin de las Mulas J. 2014.** Canine Mammary Tumours: A review and
 383 consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype assessment using
 384 immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*. 51(1): 127-145.
- 385 **24 Peña L., Nieto A.I., Pérez-Alenza D., Cuesta P. & Castaño M. 1998.**
 386 Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship
 387 to clinical and pathologic variables. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 10(3):
 388 237-246.
- 389 **25 Queiroga F.L., Raposo T., Carvalho M.I., Prada J. & Pires I. 2011.** Canine Mammary
 390 Tumours as a model to study human breast cancer: most recent findings. *In Vivo*. 25(3): 455-
 391 465.
- 392 **26 Ressel L., Puleio R., Loria G.R., Vannozzi I., Millanta F., Caracappa S. & Poli A.**
 393 **2013.** HER-2 expression in canine morphologically normal, hyperplastic and neoplastic
 394 mammary tissues and its correlation with the clinical outcome. *Research in Veterinary*
 395 *Science*. 94(2): 299-305.
- 396 **27 Ribeiro L.G.R., Damasceno K.A., Neto J.M.C., D'Assis M.J.M.H., Costa A.T., Silva**
 397 **N.S., Aguiar P.H.P., Cassali G.D. & Estrela-Lima A. 2009.** Expressão da COX-2 nos
 398 carcinomas mamários de cadelas. *Veterinária Em Foco*. (2): 134-139.
- 399 **28 Rivera P. & Euler H von. 2011.** Molecular biological aspects on canine and human
 400 mammary tumors. *Veterinary Pathology*. 48(1): 132-146.
- 401 **29 Rungsipipat A., Tateyama S., Yamaguchi R., Uchida K., Miyoshi N. & Hayashi T.**
 402 **1999.** Immunohistochemical analysis of c-yes and c-erbB-2 oncogene products and p53 tumor
 403 suppressor protein in canine mammary tumors. *The Journal of Veterinary Medical Science*.
 404 61(1): 27-32.
- 405 **30 Santos A.A., Lopes C.C., Ribeiro J.R., Martins L.R., Santos J.C., Amorim I.F.,**
 406 **Gärtner F. & Matos A.J. 2013.** Identification of prognostic factors in canine mammary
 407 malignant tumours: a multivariable survival study. *Veterinary Research*. 9(1): 1-11.
- 408 **31 Sassi F., Benazzi C., Castellani G. & Sarli G. 2010.** Molecular-based tumour subtypes of
 409 canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. *Veterinary Research*. 6(5):
 410 1-9.

- 411 **32 Sorenmo K. 2003.** Canine mammary gland tumors. *Journal of Small Animal Practice.*
412 33(3): 573-596.
- 413 **33 Sorenmo K.U., Rasotto R., Zappulli V. & Goldschmidt M.H. 2011.** Development,
414 anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of
415 canine mammary gland neoplasms. *Veterinary Pathology.* 48(1): 85-97.
- 416 **34 Toribio J.M.M.L., Lima A.E., Filho M., Ferreira E., Ribeiro L.G.R., D'Assis**
417 **M.J.M.H., Teixeira R.G., Damasceno K.A., Cassali G.D. & Neto J.M.C. 2012.** Clinical
418 characterization, histopathologic diagnosis and geoprocessing of mammary tumours in bitches
419 from the city of Salvador, Bahia State. *Revista Ceres.* 59(4): 427-433.
- 420 **35 Withrow S.J., Page R., Vail D.M., Sorenmo K.U., Deanna R.W. & Goldsmidt M.H.**
421 **2013.** Tumors of the mammary gland. In: Withrow & MacEwen's. *Small Animal Clinical*
422 *Oncology.* St. Louis: Elsevier Health Sciences. pp.538-556.
- 423 **36 Wolff A.C., Hammond M.E.H., Schwartz J.N., Hagerty K.L., Allred D.C., Cote R.J.,**
424 **Dowsett M., Fitzgibbons P.L., Hanna W.M., Langer A., McShane L.M., Paik S., Pegram**
425 **M.D., Perez E.A., Press M.F., Rhodes A., Sturgeon C., Taube S.E., Tubbs R., Vance**
426 **G.H., Vijver M.V., Wheeler T.M. & Hayes D.F. 2007.** American Society of Clinical
427 Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal
428 growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 25(1): 118-
429 145.
- 430 **37 Yamagami T., Kobayashi T., Takahashi K. & Sugiyama M. 1996.** Influence of
431 ovariectomy at the time of mastectomy on the prognosis for canine malignant mammary
432 tumours. *Journal of Small Animal Practice.* 37(10): 462-464.
- 433
- 434
- 435
- 436
- 437
- 438
- 439
- 440
- 441
- 442
- 443
- 444
- 445

446 **Tabela 1.** Frequência dos tipos histológicos de carcinomas mamários de cadelas de acordo
 447 com grau histológico, Uberlândia-MG, 2016.

Tipo Histológico	Grau			n	%
	I	II	III		
Carcinomas simples				51	51,51
carc. anaplásico	0	0	1	1	
carc. sólido	2	5	5	12	
carc. tubulopapilar	17	19	2	38	
Carcinoma complexo	18	26	2	46	46,47
Carcinoma <i>in situ</i>	-	-	-	2	2,02
Total				99	100

448

449

450

451

452

453

454

455

456

457

458

459 **Tabela 2.** Características clinicopatológicas de cadelas com neoplasia mamária e relação com
 460 os escores de imunomarcação de HER2, Uberlândia-MG, 2016.

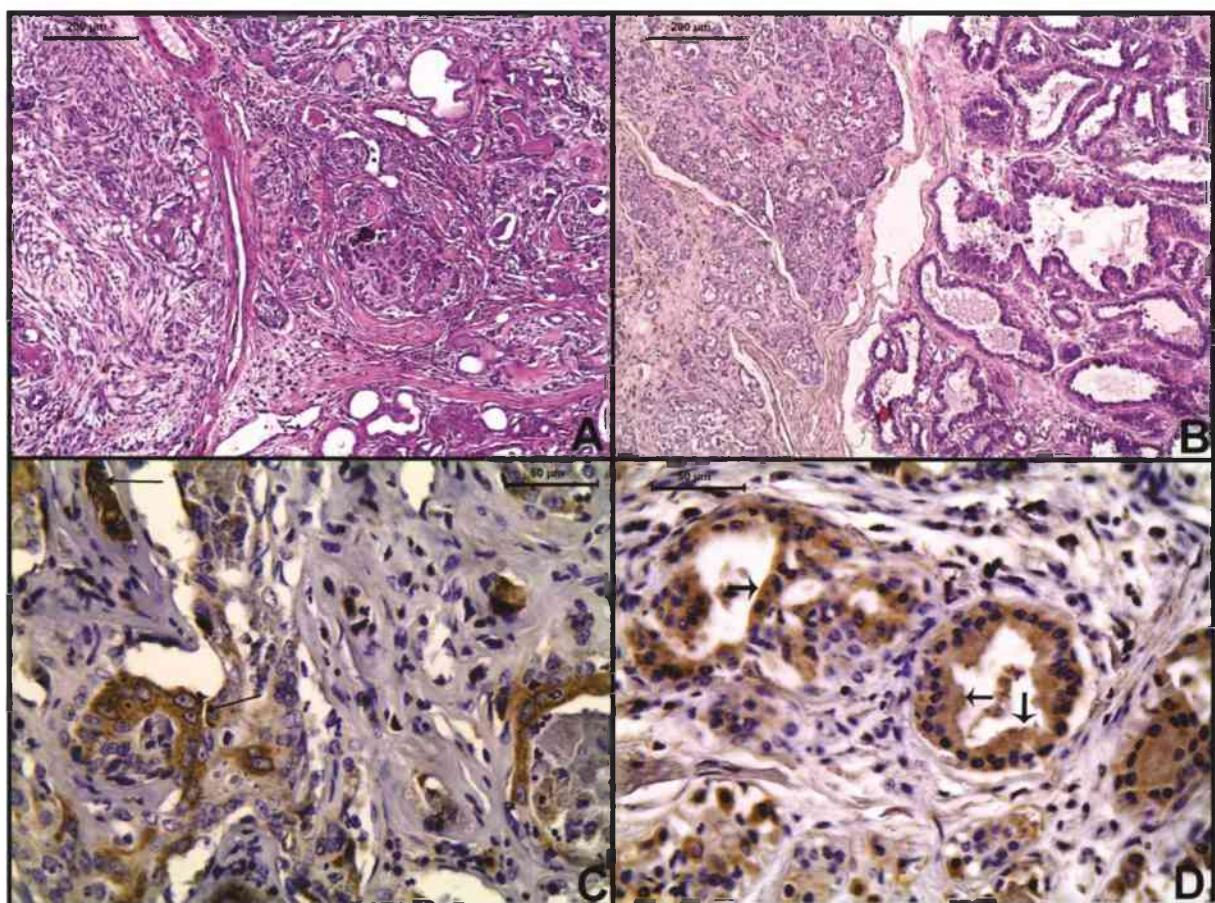
Características clinicopatológicas	n	HER2 0/ +1	HER2 +2	P
Idade (n=90)				0,09
<10 anos	37	27 (72,97%)	10 (27,03%)	
≥10 anos	53	51 (96,23%)	2 (3,77%)	
Tamanho tumoral (n=99)				0,13
<3cm	47	38 (80,85%)	9 (19,15%)	
3 a 5 cm	27	25 (92,59%)	2 (7,41%)	
> 5cm	25	23 (92%)	2 (8%)	
Estadiamento clínico (n=40)				0,10
I, II e III	30	25 (83,33%)	5 (16,67%)	
IV e V	10	10 (100%)	0	
Tipos de carcinomas (n=99)				0,69
Simples	51	46 (90,20%)	5 (9,80%)	
Complexos	46	38 (82,61%)	8 (17,39%)	
Carcinoma <i>in situ</i>	2	2 (100%)	0	
Gradação histológica (n=99)				0,51
I	37	32 (86,49%)	5 (13,51%)	
II	50	42 (84%)	8 (16%)	
III	10	10 (100%)	0	
Metástase em linfonodo (n=40)				0,43
Ausente	32	27 (84,38%)	5 (15,62%)	
Presente	8	8 (100%)	0	
Metástase a distância (n=40)				0,54
Ausente	35	30 (85,71%)	5 (14,29%)	
Presente	5	5 (100%)	0	

461

462

463

464 **Figura 1.** Fotomicrografias de carcinoma complexo e tubulopapilar em mama de cadela. **A.**
465 Carcinoma complexo mamário, hematoxilina e eosina (HE), 100X. Notar células epiteliais
466 neoplásicas organizadas ora em túbulos, ora em feixes e tecido mioepitelial proliferado. **B.**
467 Carcinoma tubulopapilar mamário, HE, 100X. Notar células epiteliais atípicas, com moderado
468 pleomorfismo, organizadas em túbulos. **C.** Imunomarcação para HER2 pela técnica de
469 imunohistoquímica em carcinoma complexo. Notar grupo de células epiteliais neoplásicas em
470 formação tubular imunomarcadas para HER2 escore +2 (seta), 100x, contra coloração,
471 Hematoxilina de Harris. **D.** Carcinoma tubulopapilar, imunomarcação HER2 escore +2,
472 100X, contra coloração hematoxilina, Uberlândia-MG, 2016.



473