

**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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Aparecida  
Medeiros-Ronchi

**UBERLÂNDIA**

**2017**

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

---

A553n      Andrade, Mariana Batista, 1984-  
2017      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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi, UFU/MG

Orientadora

---

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

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aracelle Elisane Alves, UFU/MG

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. 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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. 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<sup>a</sup>. 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 cadela, 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

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

### CAPÍTULO 2

<b>QUADRO 1:</b> 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 -----	<b>75</b>
<b>TABELA 1:</b> 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 -----	<b>76</b>
<b>TABELA 2:</b> 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 -----	<b>77</b>

### CAPÍTULO 3

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

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

<b>1. Introdução</b>	<b>13</b>
<b>2. Revisão de Literatura</b>	<b>15</b>
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
<b>Referências -----</b>	<b>49</b>
 <b>CAPÍTULO 2 - Estudo Retrospectivo de 947 Lesões Mamárias em Cadelas</b>	<b>59</b>
 <b>CAPÍTULO 3 - Fatores de Prognóstico em Carcinomas Mamários Caninos e sua Relação com Expressão de HER-2 -----</b>	<b>80</b>
-	

## **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 cadela (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 (DE NARDI 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 (RUNGSIPIPAT 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 trastuzumab<sup>1</sup> 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 cadela 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 ocitocina, 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 cadela**

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 prever 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 sobrepeso 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 sobrepeso 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 Sleenckx 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 cadela através do sistema TNM, proposto por Owen (1980)

<b>T: diâmetro máximo do tumor</b>			
<b>T<sub>0</sub>: sem evidência de tumor</b>			
<b>T<sub>1</sub>: diâmetro máximo &lt; 3cm</b>			
T <sub>1a</sub> : tumor não fixo			
T <sub>1b</sub> : tumor fixado à pele			
T <sub>1c</sub> : tumor fixado à musculatura			
<b>T<sub>2</sub>: diâmetro máximo de 3 - 5 cm</b>			
T <sub>2a</sub> : tumor não fixo			
T <sub>2b</sub> : tumor fixado à pele			
T <sub>2c</sub> : tumor fixado à musculatura			
<b>T<sub>3</sub>: &gt; 5cm de diâmetro</b>			
T <sub>3a</sub> : tumor não fixo			
T <sub>3b</sub> : tumor fixado à pele			
T <sub>3c</sub> : tumor fixado à musculatura			
<b>T<sub>4</sub>: tumor de qualquer tamanho, carcinoma inflamatório</b>			
<b>N: envolvimento de linfonodos regionais (axilar e/ou inguinal)</b>			
<b>N<sub>0</sub>: sem evidência de envolvimento de linfonodos</b>			
<b>N<sub>1</sub>: envolvimento de linfonodos ipsilaterais</b>			
N <sub>1a</sub> : linfonodos envolvidos não-fixados			
N <sub>1b</sub> : linfonodos envolvidos fixados			
<b>N<sub>2</sub>: envolvimento bilateral de linfonodos</b>			
N <sub>2a</sub> : linfonodos envolvidos não-fixados			
N <sub>2b</sub> : linfonodos envolvidos fixados			
<b>M: presença de metástases à distância</b>			
<b>M<sub>0</sub>: ausência de metástases</b>			
<b>M<sub>1</sub>: presença de metástases à distância</b>			
ESTÁGIO	T	N	M
I	T <sub>1a</sub> , b ou c	N <sub>0</sub> ou N <sub>1a</sub> (-) ou N <sub>2a</sub> (-)	M <sub>0</sub>
II	T <sub>0</sub>	N <sub>1</sub> (+)	M <sub>0</sub>
	T <sub>1</sub> , b ou c	N <sub>1</sub> (+)	
	T <sub>2</sub> , b ou c	N <sub>0</sub> (+) ou N <sub>1a</sub> (+)	
III	Qualquer T <sub>3</sub>	Qualquer N	M <sub>0</sub>
	Qualquer T	Qualquer N <sub>b</sub>	
IV	Qualquer T	Qualquer N	M <sub>1</sub>



(-) = 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 cadela através do sistema TMN, proposto por Rutteman, Withrow e MacEwen (2001).

T: diâmetro máximo do tumor			
T <sub>1</sub> : diâmetro máximo < 3cm			
T <sub>2</sub> : diâmetro máximo de 3 - 5 cm			
T <sub>3</sub> : > 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 <sub>1</sub>	N0	M0
II	T <sub>2</sub>	N0	M0
III	T <sub>3</sub>	N0	M0
IV	Qualquer	N1	M0
V	Qualquer	Qualquer	M1

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, pobremente 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 epiteliomose 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 hipercromáticos, 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 cadela, 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 arrançadas 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 pobremente 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 lumbais 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 hematogena. 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 cribriforme 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 cadela, 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 anisocariose 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. Seguindo 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 cribriforme. 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 cribriforme**

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 hiper cromáticos, 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 cribriforme 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 intersticial esparsos. 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 frouxo 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 abscessos. 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 cartilagosos, 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 pobremente 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 basofílico, 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 lâmina 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 cadela, 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 pericanalículares ou periductais – ou comprimir os túbulos, levando à sua deformação – fibroadenomas intracanalículares 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 proliferam 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 lumbais formam uma camada única no interior do ducto, possuem núcleos ovais normocrômicos 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 hipercromático, 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 lumbais 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 debris 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 cadela**

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-oncogene, 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 (RUNGSIIPAT 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% (RUNGSIIPAT 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 Rungsipipat et al. (1999), Kim et al. (2011) e Ressel et al. (2013) que detectaram 50%, 16,7% e 27,3% de imunomarcção 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 Rungsipipat 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 sobrevivência 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 (RUNGSIPIPAT 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 (RUNGSIPIPAT 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 EFGR 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](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.

BURRAI, 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 cadela – 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 Biolology**, 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/bjmbbr/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](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/pdf/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 cadela**. 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.; MAC EWEN, 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://bmcvetres.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-Cytopathological 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.

SONNENSCHN, 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 Andrade<sup>1</sup>, Ednaldo Carvalho Guimarães<sup>2</sup>, Arlinda Flores Coletto<sup>1</sup>,  
Nicolle Pereira Soares<sup>1</sup> & Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi<sup>3</sup>**

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

<sup>2</sup>Faculdade de Matemática, UFU. Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

<sup>3</sup>Laboratório de Patologia Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, UFU. Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

**ABSTRACT**

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

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

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

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

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

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

## INTRODUÇÃO

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

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

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

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

## MATERIAIS E MÉTODOS

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

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

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

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



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

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

## RESULTADOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## DISCUSSÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## CONCLUSÕES

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

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

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

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

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

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

## REFERENCES

- 1 **ACTION.** Disponível em: <<http://www.portalaction.com.br>>. [Acessado em 07/2015].
- 2 **Ayres M., Ayres Jr M., Ayres D.L. & Santos A.S. 2007.** BioEstat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília: CNPq. 364 p.
- 3 **Benjamin S.A., Lee A.C. & Saunders W.J. 1999.** Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles. *Veterinary Pathology*. 36(5): 423-436.
- 4 **Biase N.G. & Ferreira D.F. 2009.** Comparações múltiplas e testes simultâneos para parâmetros binomiais de K populações independentes. *Revista Brasileira de Biometria*. 27(3): 301-323.
- 5 **Cassali G.D. 2003.** Patologia da glândula mamária. In: Nascimento E.F. & Santos R.L. (Eds). *Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp.119-133.
- 6 **Cassali G.D., Lavallo G.E., Ferreira E., Estrela-Lima A., De Nardi A.B., Ghever C., Sobral R.A., Amorim R.L., Oliveira L.O., Sueiro F.A.R., Beserra H.E.O., Bertagnolli A.C., Gamba C.O., Damasceno K.A., Campos C.B., Araújo M.R., Campos L.C., Monteiro L.N., Nunes F.C., Horta R.S., Reis D.C., Luvizotto M.C.R., Magalhães G.M., Raposo J.B., Ferreira A.M.R., Tanaka N.M., Grandi F., Ubukata R., Batschinski K., Terra E.M., Salvador R.C.L., Jark P.C., Delecrodi J.E.R., Nascimento N.A., Silva D.N., Silva L.P., Ferreira K.C.R.S., Frehse M.S., Di Santis G.W., Silva E.O., Guim T.N., Kerr B., Cintra P.P., Silva F.B.F., Leite J.S., Mello M.F.V., Ferreira M.L.G., Fukumasu H., Salgado B.S. & Torres R. et al. 2014.** Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors - 2013. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*. 7(2): 38-69.
- 7 **Chang S.C., Chang C.C., Chang T.J. & Wong M.L. 2005.** Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998–2002). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 227(10): 1625–1629.
- 8 **Daleck C.R., Franceschini P.H., Alessi P.H., Santana A.C. & Martins M.I.M. 1998.** Aspectos clínico e cirúrgicos do tumor mamário canino. *Ciência Rural*. 28(1): 95-100.



**9 De Nardi A.B., Rodaski S., Sousa R.S., Costa T.A., Macedo T.R., Rodigheri S.M., Rios A. & Piekarz C.H. 2002.** Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal do Paraná. *Archives of Veterinary Science*. 7(2): 15-26.

**10 Donnay I., Rauis J., Devleeshiuwer N., Wouters-Ballman P., Leclercq G. & Verstegen J. 1995.** Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs. *American Journal of Veterinary Research*. 56(9): 1188-1194.

**11 Egenvall A., Bonnett N.B., Öhagen P., Olson P., Hedhammar A. & Von Euler H. 2005.** Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Preventive Veterinary Medicine*. 69(1-2): 109-127.

**12 Ferreira E., Bertagnolli A.C., Cavalcanti M.F., Schmitt F.C. & Cassali G.D. 2009.** The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*. 7(4): 230-235.

**13 Figuera R.A., Souza T.M., Silva M.C., Brum J.S., Graça D.L., Kommers G.D., Irigoyen L.F. & Barros C.S.L. 2008.** Causas de morte e razões para eutanásia de cães da Mesorregião do Centro Ocidental Rio-Grandense (1965-2004). *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 28(4): 223-230.

**14 Hashimoto S., Yamamura H., Sato T., Kanayama K. & Sakai T. 2002.** Prevalence of mammary gland tumor of small breed dog in the Tokyo metropolitan area. *Journal of Veterinary Epidemiology*. 6(2): 85-91.

**15 Itoh T., Uchida K., Ishikawa K., Kushima K., Kushima E., Tamada H., Moritake T., Nakao H. & Shii H. 2005.** Clinicopathological survey of 101 canine mammary gland tumors: Differences between small-breed dogs and others. *Journal of Veterinary Medical Science*. 67(3): 345-347.

**16 Karayannopoulou M., Kaldrimidou E. & Dessiris A. 1990.** Some epidemiological aspects of canine mammary tumours treatment and prognosis. *European Journal of Companion Animal Practice*. 1(1): 41-47.

**17 Martins A.M.C.R.P.F., Tamaso E. & Guerra J.L. 2002.** Retrospective review and systematic study of mammary tumors in dogs and characteristics of the extracellular matrix. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 39(1): 38-42.

**18 Misdorp W., Else R.W., Hellmen E. 1999.** Definitions and explanatory notes. In: \_\_\_\_\_. Who histological classification of mammary tumors of the dog and cat. Washington: Armed Forces Institute of Pathology. cap. 3. pp. 18-27.

**19 Misdorp W. 2002.** Tumors of the mammary gland. In: Meuten D.J. (Ed.). *Tumors in Domestic Animals*. 4 ed. Ames: Iowa State Press, pp.575-606.

**20 Morris J.S., Dobson J.M., Bostock D.E. & O'Farrell E. 1998.** Effect of ovariohysterectomy in bitches with mammary neoplasms. *Veterinary Record*. 142(24):656-658.

**21 Morrison W.B. 1998.** Canine and feline mammary tumors. In: Morrison, W.B. (Ed). *Cancer in dogs and cats. – medical and surgical management*. Baltimore: Williams & Wilkins, pp. 591-598.

**22 Nagata W.B., Perri S.H. V., Eugênio F.R., Laranjeira M.G. & Andrade A.L. 2014.** Perfil epidemiológico da neoplasia mamária canina em Araçatuba: uma abordagem estatística. *Revista Estatística UFOP*. 3(3): 669-673.

**23 Oliveira L.O., Oliveira R.T., Loretto A.P., Rodrigues R. & Driemeier D. 2003.** Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. *Acta Scientiae Veterinariae*. 31(2): 105-110.

**24 Oliveira Filho J.C., Kommers G.D., Masuda E.K., Marques B.M.F.P.P., Figuera R.A., Irigoyen L.F. & Barros C.S.L. 2010.** Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 30(2): 177-185.

**25 Pinheiro L.G.P., Moraes M.O., Soares A.H., Lopes A.J.T., Nagueire M.A.S., Gondim F.A.L., Brandão C.B., Nascimento D.C.H., Soares J.P.H., Silva, J.M.M. 2003.** Estudo experimental de linfonodo sentinela na mama da cadela com azul patente e Tecnécio Tc99m. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 18(6): 545–552.

**26 R DEVELOPMENT CORE TEAM. R. 2015.** A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <<http://www.r-project.org>>. [Acessado em 05/2015].

**27 Rutteman G.R., Withrow S.J. & MacEwen E.G. 2001.** Tumors of the mammary gland. In: Withrow S.J. & MacEwen E.G. (Eds). *Small Animal Clinical Oncology*. 3ed. Philadelphia: W.B. Saunders, pp.455-477.

**28 Santos I.F.C., Cardoso J.M.M., Oliveira K.C., Laisse C.J.M. & Bessa S.A.T. 2013.** Prevalência de neoplasias diagnosticadas em cães no Hospital Veterinário da Universidade Eduardo Mondlane, Moçambique. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 65(3): 773-782.

**29 Sleenckx N., Rooster H., Veldhuis Kroeze E.J.B., Van Ginneken C. & Van Brantegem L. 2011.** Canine Mammary Tumours, an Overview. *Reproduction in Domestic Animals*. 46(6): 1112-1131.

**30 Sorenmo K.U. 2003.** Canine mammary gland tumors. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal. Practice*. 33(3): 573-596.

**31 Sorenmo K.U., Kristiansen V.M., Cofone M.A., Shofer F.S., Breen A.M., Langeland M., Mongil C.M., Grondahl A.M., Teige J. & Goldschmidt M.H. 2009.** Canine mammary gland tumors - a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Veterinary and Comparative Oncology*. 7(3): 162-172.

**32 Souza T.M., Figuera R.A., Irigoyen L.F., Barros C.S.L. 2006.** Estudo retrospectivo de 761 tumores cutâneos em cães. *Ciência Rural*. 36(2): 555-560.

**33 Stratmann N., Failing K., Richter A. & Wehrend A. 2008.** Mammary tumor recurrence in bitches after regional mastectomy. *Veterinary Surgery*. 37(1): 82-86.

**34 Toríbio J.M.M., Lima A. E., Filho E.F.M., Ribeiro L. G. R., D'Assis M. J. M. H., Teixeira R. G., Damasceno K. A., Cassali G.D. & Neto J. M. C. 2012.** Caracterização clínica, diagnóstico histopatológico e distribuição geográfica das neoplasias mamárias em cadelas de Salvador, Bahia. *Revista Ceres*. 59(4): 427-433.

**35 Withrow S.J. 1992.** Biopsy principles. In: *XVII WSAVA. World Congress* (Roma, Itália). p.1221-1226.

**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.

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

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

	Variável

	Idade			Localização				Ulceração		
<b>Tipo de Tumor</b>	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
<b>Total</b>	239	547		111	188	302		148	70	

<b>Tamanho do tumor</b>	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
<b>Total</b>	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>Frequência (n)</i>	<i>Percentual</i>	<i>Percentual Total</i>
		<i>Grupo (%)</i>	<i>de Lesões (%)</i>

<hr/>			
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
<hr/>			

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			
Hemangiossarcoma	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**)

## 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

**Nicolle Pereira Soares<sup>1</sup>, Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi<sup>1</sup>, Igor de Paula Castro<sup>1</sup>,**

**Taís Meziara Wilson<sup>1</sup>, Thaís de Almeida Moreira<sup>1</sup> & Mariana Batista Andrade**

<sup>1</sup>Laboratório de Patologia Animal, Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV), Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas Gerais, MG, Brasil.

**CORRESPONDENCE:** N.P. Soares [nicolle.pereira@hotmail.com – Tel +55 (34)3291-8432].

Laboratório de Patologia Animal, Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV), Programa de pós graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Uberlândia – UFU, Rua Ceará, s/n, Bloco 2D, Campus Umuarama, Bairro Umuarama, CEP: 39408-902, Uberlândia, Minas Gerais, MG, Brasil.

## ABSTRACT

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

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

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

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

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

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

## INTRODUÇÃO

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

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

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

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

## MATERIAIS E MÉTODOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## RESULTADOS

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

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

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

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

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

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

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



## DISCUSSÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## CONCLUSÃO

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

## SOURCES AND MANUFACTURERS

<sup>1</sup>Anticorpo anti HER2 monoclonal SP3- SAB5500080- Sigma- Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA.

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

<sup>3</sup>Diaminobenzina - DAKO- K3468, DAB, Carpinteria, California, EUA.

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

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

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

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

## REFERÊNCIAS

- 1 Almasri N.M. & Al Hamad M. 2005.** Immunohistochemical evaluation of human epidermal growth factor receptor 2 and estrogen and progesterone receptors in breast carcinoma in Jordan. *Breast Cancer Research*. 7(5): 598-604.
- 2 Bertagnolli A.C., Ferreira E., Dias E.J. & Cassali. G.D. 2011.** Canine mammary mixed tumours: immunohistochemical expressions of EGFR and HER-2. *Australian Veterinary Journal*. 89(8): 312-317.
- 3 Beselga A.G. 2013.** Avaliação da expressão do recetor HER-2 em carcinomas mamários caninos. 91f. Lisboa. Dissertação (Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa.
- 4 Burrai G.P., Tanca A., De Miglio M.R., Abbondio M., Pisanu S., Polinas M., Pirino S., Mohammed S.I., Uzzau S., Addis M.F. & Antuofermo E. 2015.** Investigation of HER2 expression in canine mammary tumors by antibody-based, transcriptomic and mass spectrometry analysis: is the dog a suitable animal model for human breast cancer? *Tumour Biology*. 36(11): 9083-9091.
- 5 Cassali G.D., Lavallo G.E., Ferreira E., Estrela-Lima A., de Nardi A.B., Ghever C., Sobral R.A., Amorim R.L., Oliveira L.O., Sueiro F.A.R., Beserra H.E.O., Bertagnolli A.C., Gamba C.O., Damasceno K.A., Campos C.B., Araujo M.R., Campos L.C., Monteiro L.N., Nunes F.C., Horta R.S., Reis D.C., Luvizotto M.C.R., Magalhães G.M., Raposo J.B., Ferreira A.M.R., Tanaka N.M., Grandi F., Ubukata R., Bastchinski K., Terra E.M., Salvador R.C.L., Jark P.C., Delecrodi J.D.R., Nascimento N.A., Silva D.N., Silva L.P., Ferreira K.C.R.S., Frehse M.S., di Santis G.W., Silva E.O., Guim T.N., Kerr B., Cintra P.P., Silva F.B.F., Leite J.S., Mello M.F.V., Ferreira M.L.G., Fukumasu H., Salgado B.S. & Torres R. 2014.** Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors - 2013. *Brazilian Journal Veterinary Pathology*. 7(2): 38-69.
- 6 Dutra A.P., Granja N.V.M., Schmitt F.C. & Cassali G.D. 2004.** c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. *Brazilian Journal Medical Biology Research*. 37(11): 1673-81.
- 7 Elston C.W. & Ellis I.O. 1991.** 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*. 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 cadela. 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. & Haghdooost 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.

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



**32 Sorenmo K. 2003.** Canine mammary gland tumors. *Journal of Small Animal Practice*. 33(3): 573-596.

**33 Sorenmo K.U., Rasotto R., Zappulli V. & Goldschmidt M.H. 2011.** Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Veterinary Pathology*. 48(1): 85-97.

**34 Toríbio J.M.M.L., Lima A.E., Filho M., Ferreira E., Ribeiro L.G.R., D'Assis M.J.M.H., Teixeira R.G., Damasceno K.A., Cassali G.D. & Neto J.M.C. 2012.** Clinical characterization, histopathologic diagnosis and geoprocessing of mammary tumours in bitches from the city of Salvador, Bahia State. *Revista Ceres*. 59(4): 427-433.

**35 Withrow S.J., Page R., Vail D.M., Sorenmo K.U., Deanna R.W. & Goldsmith M.H. 2013.** Tumors of the mammary gland. In: Withrow & MacEwen's. *Small Animal Clinical Oncology*. St. Louis: Elsevier Health Sciences. pp.538-556.

**36 Wolff A.C., Hammond M.E.H., Schwartz J.N., Hagerty K.L., Allred D.C., Cote R.J., Dowsett M., Fitzgibbons P.L., Hanna W.M., Langer A., McShane L.M., Paik S., Pegram M.D., Perez E.A., Press M.F., Rhodes A., Sturgeon C., Taube S.E., Tubbs R., Vance G.H., Vijver M.V., Wheeler T.M. & Hayes D.F. 2007.** American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 25(1): 118-145.

**37 Yamagami T., Kobayashi T., Takahashi K. & Sugiyama M. 1996.** Influence of ovariectomy at the time of mastectomy on the prognosis for canine malignant mammary tumours. *Journal of Small Animal Practice*. 37(10): 462-464.

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

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

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

<b>Características clinicopatológicas</b>	<b>n</b>	<b>HER2 0/ +1</b>	<b>HER2 +2</b>	<b>P</b>
<b>Idade (n=90)</b>				0,09
<10 anos	37	27 (72,97%)	10 (27,03%)	
≥10 anos	53	51 (96,23%)	2 (3,77%)	
<b>Tamanho tumoral (n=99)</b>				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%)	
<b>Estadiamento clínico (n=40)</b>				0,10
I, II e III	30	25 (83,33%)	5 (16,67%)	
IV e V	10	10 (100%)	0	
<b>Tipos de carcinomas (n=99)</b>				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	
<b>Gradação histológica (n=99)</b>				0,51
I	37	32 (86,49%)	5 (13,51%)	
II	50	42 (84%)	8 (16%)	
III	10	10 (100%)	0	
<b>Metástase em linfonodo (n=40)</b>				0,43
Ausente	32	27 (84,38%)	5 (15,62%)	
Presente	8	8 (100%)	0	
<b>Metástase a distância (n=40)</b>				0,54
Ausente	35	30 (85,71%)	5 (14,29%)	
Presente	5	5 (100%)	0	

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

