

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

LARISSA FERNANDES MAGALHÃES

ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO NO GENE DA ENZIMA *CATECOL-O-METILTRANSFERASE (COMT)* COM EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE ESTRÓGENO E VARIÁVEIS CLINICOPATOLÓGICAS DE CADELAS COM NEOPLASIAS MAMÁRIAS

UBERLÂNDIA – MG

2018

LARISSA FERNANDES MAGALHÃES

ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO NO GENE DA ENZIMA *CATECOL-O-METILTRANSFERASE (COMT)* COM EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE ESTRÓGENO E VARIÁVEIS CLINICOPATOLÓGICAS DE CADELAS COM NEOPLASIAS MAMÁRIAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Saúde Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi.

UBERLÂNDIA-MG

2018

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

M188a
2018

Magalhães, Larissa Fernandes, 1991
Associação do polimorfismo no gene da enzima Catecol-O-Metiltransferase (COMT) com expressão de receptores de estrógeno e variáveis clinicopatológicas de cadelas com neoplasias mamárias [recurso eletrônico] / Larissa Fernandes Magalhães. - 2018.

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

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.1201>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Veterinária. 2. Mamas - Câncer. 3. Cão - Doenças. 4. Estrogênios.
I. Medeiros-Ronchi, Alessandra Aparecida, 1971, (Orient.) II.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LARISSA FERNANDES MAGALHÃES – Nascida em Araguari – MG, em 08 de maio de 1991, filha de João Gonçalves de Magalhães e Eloiza Maria Fernandes Magalhães. Médica Veterinária, graduada em janeiro de 2014 pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Aprimoramento (2014 e 2015), na área de Patologia Animal e Laboratório Clínico pela Universidade de Franca (UNIFRAN). Desde 2016 é docente na UNIFRAN, ministrando disciplinas de Patologia Geral, Patologia Especial e Histologia/Embriologia Veterinária. Responsável pelo Setor de Patologia Animal do Hospital Veterinário da UNIFRAN e mestrandona área de Patologia Animal, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – UFU.



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**



Ata da defesa de Dissertação de **MESTRADO ACADÊMICO** junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de: Dissertação de mestrado acadêmico nº **PPGCV/012/2018**

Data: 13/08/2018

Discente: **Larissa Fernandes Magalhães** – Matrícula – 11612MEV013

Título da Dissertação: **ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO DO GENE CATECOL-O-METILTRANSFERASE (COMT) COM EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE ESTRÓGENO E VARIÁVEIS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE CADELAS COM NEOPLASIAS MAMÁRIAS.**

Área de concentração: SAÚDE ANIMAL

Linha de pesquisa: CLÍNICA MÉDICA E INVESTIGAÇÃO ETIOLÓGICA

Projeto de Pesquisa de vinculação: PATOLOGIA ONCOLÓGICA E EPIDEMIOLOGIA DAS NEOPLASIAS DOS ANIMAIS DOMÉSTICOS

No dia 13 de Agosto do ano de 2018, às 09:00 horas, na sala de vídeo conferência da Biblioteca – Campus Santa Mônica da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Comissão Julgadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, composta pelos Professores(as)/Doutores(as): **Geórgia Modé Magalhães** – INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÉNCIA E TECNOLOGIA DO SUL DE MINAS GERAIS – CAMPUS MUZAMBINHO; **RAQUEL ALVES DOS SANTOS** – UNIVERSIDADE DE FRANCA e **Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi** orientadora da candidata. Ressalta-se que as Profas. Dras. Geórgia Modé Magalhães e Raquel Alves dos Santos participaram da defesa por meio de Vídeo Conferência desde a cidade de Muzambinho, MG e Franca, SP, respectivamente e os demais membros da banca e o aluno participaram *in loco*.

Iniciando os trabalhos a presidente da comissão Dra. Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi concedeu a palavra à candidata para uma exposição do seu trabalho, contando com o tempo máximo de 50 minutos. A seguir a senhora presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir a candidata, durante o prazo máximo de (30) minutos, assegurando-se ao mesmo igual prazo para resposta. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Comissão Julgadora, em sessão secreta, considerou a candidata APROVADA.

Esta defesa de dissertação de mestrado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme Regulamento do Programa, Legislação e a Regulamentação Interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar a Presidente encerrou os trabalhos às 11 horas e 40 minutos, lavrou esta ata que será assinada por todos os membros da Comissão Examinadora. Uberlândia, 13 de Agosto de 2018.

Participou por vídeo conferência

Profa. Dra. Geórgia Modé Magalhães

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÉNCIA E
TECNOLOGIA DO SUL DE MINAS – CAMPUS MUZAMBINHO

Participou por vídeo conferência

Profa. Dra. Raquel Alves dos Santos

UNIVERSIDADE DE FRANCA

Profa. Dra. Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi

ORIENTADORA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÉNCIAS VETERINÁRIAS

Rua Ceará, s/nº Bloco 2D – Sala 03 - Campus Umuarama - 38400-902 - Uberlândia - MG

Fone: +55 – 34 – 3218-2494

E-mail: mesvet@ufu.br

Endereço Eletrônico: <http://www.mestrado.famev.ufu.br>

AGRADECIMENTOS

À Deus pela força e fé que me mantêm centrada e por sempre iluminar meus passos.

À minha Família que sempre me incentivou a seguir nos estudos, que está comigo em todos os momentos, me apoiando, não medindo esforços e fazendo o melhor por mim. Em especial a minha irmã, Ludmilla, que abdicou algumas viagens por causa dos meus estudos, espero compensá-la.

À Flávia por me amparar em todos os momentos, principalmente naqueles difíceis e de incertezas. À Luisa Pucci por ser minha família francesa, me acolhendo sempre. À Amanda, Nathi e Mi que transformaram o convívio diário em amizade eterna. À Tais Meziara que mesmo que o destino colocou “Km” nos distanciando fisicamente, sei que posso contar como, quando e onde eu estiver.

Aos residentes da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e aos da Universidade de Franca (UNIFRAN) pela ajuda nas coletas, especialmente à Érica por ser “minha extensão” em Uberlândia, sempre altruísta, positiva e com bom humor.

Ao José Luiz, que não só me proporciona felicidade com o trabalho maravilhoso que realiza, mas também por todo apoio, companheirismo e carinho diário.

Ao Igor pela paciência e por sempre ser solícito.

À Professora Raquel, atenciosa e carinhosa, agradeço por ter disponibilizado seu Laboratório e seu tempo (precioso) sempre que necessitei.

À Alana, pela paciência, pensamento positivo e companheirismo durante o processamento das amostras.

À querida Professora Geórgia, que foi minha mãezona por dois anos em Franca (Gustavo terá esse privilégio para vida toda), me ensinando não só, tudo que sei, sobre Patologia Animal, mas principalmente como ser sensata e profissional, sendo grande exemplo de humildade, carisma e dedicação.

À Professora Alessandra por ser uma das pessoas que mais admiro na vida, em todos os sentidos, por ter despertado em mim a paixão pela Patologia, por ter me acolhido novamente e por sempre irradiar boas energias por onde passa.

Foram inúmeras pessoas que contribuíram de várias formas para que fosse possível realizar este trabalho, por isso, as demais pessoas que aqui não nomeei, mas que me auxiliaram e apoiaram de alguma forma, meu muito obrigado.

“Desistir? Eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério. É que tem mais chão nos meus olhos do que cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça.”

Cora Coralina

RESUMO

A *Catecol-O-Metiltransferase (COMT)* é uma enzima que participa na inativação de metabólitos de estrógeno que são potencialmente carcinogênicos. O polimorfismo no gene que codifica esta enzima influencia na sua capacidade de atividade. O status do receptor de estrógeno na cadelha pode ser um fator determinante na influência do genótipo *COMT* no resultado de neoplasias mamárias. Por isso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a correlação entre o polimorfismo do genótipo *COMT* e o status do receptor de estrógeno, além de verificar a relação do polimorfismo da enzima com variáveis clinicopatológicas. Foram utilizadas 59 cadelas, sendo 51 com neoplasias mamárias (GE) e oito sem neoplasia mamária (GC). O polimorfismo da enzima foi avaliado por meio de PCR-RFLP e os receptores de estrógeno (RE- α) por imuno-histoquímica (IHQ). Na IHQ, 19,6% e 87,5% dos tumores expressaram receptor de estrógeno no GE e GC, respectivamente. A PCR foi realizada em 42 animais. Dezessete cadelas (47,2%) do GE e apenas uma do GC (16,6%) apresentaram polimorfismo (genótipo GA). Não houve correlação entre o polimorfismo e as variáveis clinicopatológicas, assim como entre a expressão de RE α e o polimorfismo da enzima ($p=0.148$) em análise univariada. Porém houve correlação do polimorfismo com a ocorrência de carcinoma receptor de estrógeno negativo na análise de regressão múltipla. Por isso, conclui-se que cadelas portadoras de polimorfismo da enzima *COMT* desenvolvem com maior frequência carcinoma mamário receptor de estrógeno negativo.

Palavras-chave: carcinoma mamário; *COMT G482A*; estrógeno; influência genética; polimorfismo.

ABSTRACT

Catechol-O-methyltransferase (COMT) is an enzyme that acts in the inactivation of estrogen metabolites, which are potentially carcinogenic. The gene polymorphism that codifies this enzyme influences in its activity capacity. The estrogen receptor status of the bitch may be a determining factor in the influence of the COMT genotype in the result of mammary neoplasia. Thus, the aim of the present study was to evaluate the correlation between the the polymorphism of the COMT genotype and the status of the estrogen receptor, besides verifying the relation of the enzyme polymorphism with clinicopathological variables. A total of 59 bitches were used, of which 51 had mammary neoplasms (EG) and eight had no mammary neoplasia (CG). The enzyme polymorphism was evaluated through PCR-RFLP and the estrogen receptors (RE- α) through immunohistochemistry (IHQ). In IHQ, 19,6% and 87,5% of the tumors expressed estrogen receptor in EG and CG, respectively. PCR was performed in 42 animals. Seventeen dogs (47,2%) from EG and only one from CG (16,6%) presented polymorphism (GA genotype). There was no correlation between polymorphism and clinopathological variables, as well as between RE α expression and enzyme polymorphism ($p = 0.148$) in univariate analysis. However, there was correlation of the polymorphism with the occurrence of negative estrogen receptor carcinoma in the multiple regression analysis. Therefore, the conclusion was that female dogs with polymorphism of the COMT enzyme develop more frequently estrogen negative receptor mammary carcinoma.

Keywords: mammary carcinoma; COMT G482A; estrogen ; genetic influence; polymorphism.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2:

Tabela 1. Características clinicopatológicas de cadelas com neoplasia mamária e expressão de receptores de estrógeno. p. 36

Tabela 2. Correlação entre o polimorfismo da enzima *COMT* com comportamento tumoral, expressão de receptores de estrógeno e tipo histológico em carcinomas mamários, e metástase em linfonodo de cadelas portadoras de neoplasias mamárias. p. 39

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1:

Figura 1. Produção e catabolismo do estrógeno. p. 19

CAPÍTULO 2:

Figura 1. Fotomicrografias de marcação imuno-histoquímica (IHQ) de receptores de estrógeno (RE α). Método complexo streptavidina-biotina-peroxidase, cromógeno DAB, anticorpo primário anti-RE α , contracoloração com hematoxilina de Mayer, objetiva 40x. Bar _ 50 μ m. (A) Útero de cadela – controle positivo. Marcação nuclear nas células epiteliais das glândulas uterinas. (B) Adenoma complexo positivo para expressão de RE α . Marcação nuclear nas células epiteliais mamárias neoplásicas (seta). (C) Carcinoma mamário em tumor misto positivo para expressão de RE α . Marcação nuclear nas células epiteliais mamárias neoplásicas (seta). (D) Carcinoma mamário em tumor misto negativo para expressão de RE α . Ausência de marcação nuclear nas células epiteliais mamárias neoplásicas. p. 38

Figura 2. Análise RFLP baseada em PCR no gene *COMT* de cadelas com neoplasia mamária (GE). Linha 1 com marcador de peso molecular, linha 2 produto de PCR sem digestão. Linhas 3, 4, 6 e 7 contem DNA de cadelas sem polimorfismo (GG) e linha 5 de cadela com polimorfismo (GA). p. 39

SUMÁRIO

CAPITULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	10
2.1 TUMOR DE MAMA NAS CADELAS (TMC).....	10
2.1.1 EPIDEMIOLOGIA.....	10
2.1.2 FATORES PROGNÓSTICOS.....	11
2.1.3 DIAGNÓSTICO.....	12
2.2 TRATAMENTO DE NEOPLASIAS MAMÁRIAS.....	13
2.3 RECEPTOR DE ESTRÓGENO (ER) NA GLÂNDULA MAMÁRIA.....	13
2.4 CATECOL - O - METILTRANSFERASE (COMT).....	17
REFERÊNCIAS.....	22
 CAPÍTULO 2 – POLIMORFISMO DA ENZIMA COMT E SUA CORRELAÇÃO COM EXPRESSÃO DE RECEPTOR DE ESTRÓGENO E VARIÁVEIS CLINICOPATOLÓGICAS EM CADELAS COM NEOPLASIAS MAMÁRIAS.....	30
1. INTRODUÇÃO.....	31
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
2.1 ANIMAIS E OBTENÇÃO DE AMOSTRAS.....	32
2.2 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	33
2.3 IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	33
2.4 EXTRAÇÃO DE DNA.....	34
2.5 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR).....	34
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
3. RESULTADOS.....	35
4. DISCUSSÃO.....	40
REFERÊNCIAS.....	44

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

As neoplasias mamárias são as mais frequentes na cadela, representando de 50 a 70% dos tumores em fêmeas não castradas, especialmente nos países onde a ovariohisterectomia é infrequente (MOE, 2001). Hormônios esteróides desempenham um importante papel na patogênese dos tumores mamários caninos, assim como se observa nas mulheres (GOLDSCHMIDT, PEÑA e ZAPPULLI, 2017).

Exposição crônica ao estrógeno é um fator de risco para desenvolvimento do tumor de mama nas mulheres (TRAVIS E KEY, 2003). Altas concentrações séricas de estradiol foram associadas a um maior risco de desenvolvimento de neoplasia mamária em mulheres no período pós-menopausa (KEY et al., 2002; LIM et al., 2014).

Um dos mecanismos de inativação de metabólitos carcinogênicos é feito pela enzima *Catecol-metil-transferase (COMT)*. Em humanos há um polimorfismo de nucleotídeo único no gene *COMT* (*COMT val158met*) que tem sido relacionado a uma maior chance de desenvolver câncer de mama, já que mulheres portadoras deste polimorfismo apresentam menor atividade desta enzima. Nos cães, existe um polimorfismo de nucleotídeo único no gene *COMT* (*G482A*). Animais acima de 9 anos de idade e portadores do alelo A tem chance três vezes maior de desenvolverem tumor de mama quando comparados aos não portadores deste alelo (PEREIRA et al., 2008).

A análise comparativa das alterações transcricionais que ocorrem nos tumores de mama da cadela e da mulher confirmam semelhanças que enfatizam a utilização da cadela como modelo experimental, sendo útil na avaliação de novas estratégias terapêuticas contra o câncer e o desenvolvimento de biomarcadores prognósticos e diagnósticos a serem usados em estudos clínicos (UVA et al., 2009).

Glândulas mamárias normais de cadelas apresentam receptores de estrógeno (ER), porém a expressão destes receptores decresce em hiperplasias e mais ainda em tumores malignos (GOLDSCHMIDT, PEÑA e ZAPPULLI, 2017).

O status do receptor de estrógeno de cada animal pode ser um fator determinante na influência do genótipo *COMT* no resultado de neoplasias mamárias e sua avaliação poderia ser uma estratégia útil para avaliar valor prognóstico do genótipo *COMT* em cadelas que expressam ou não receptor de estrógeno (PEREIRA et al., 2009).

A relação da expressão de ER com o polimorfismo da enzima *COMT* em neoplasias mamárias de cadelas ainda não foi demonstrada e necessita de estudos. Por isso, o presente trabalho teve como objetivo principal avaliar esta correlação, além de avaliar a relação do polimorfismo no gene da enzima *COMT* com variáveis clinicopatológicas, como tipo histológico, presença de metástase e idade de surgimento da neoplasia mamária em cadelas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tumor de mama nas cadelas (TMC)

2.1.1 Epidemiologia

Em cadelas, neoplasias malignas na glândula mamária ocorrem mais frequentemente que as benignas (CHANG et al., 2009), com cerca de 70% dos tumores mamários sendo malignos (RASOTTO et al., 2017). A frequência de tumores malignos pode variar devido a diferenças intrínsecas nas populações estudadas e por existir variabilidade interobservador no diagnóstico, muitas vezes superestimando as características de malignidade (SANTOS et al., 2014).

As mamas abdominais caudais e inguinais são as mais acometidas, com frequência em torno de 70% (YANG et al., 2006; NGUYEN et al., 2017). O tamanho dos nódulos tumorais pode variar, com aproximadamente 54% dos nódulos apresentando tamanho ≥ 2 cm (KIM et al., 2014). Quanto à idade média das cadelas com neoplasia mamária, vários autores relatam idade entre 9,6 a 10,4 anos (SASSI et al., 2010; MOHR et al., 2016; SPOERRI et al., 2015; CHANG et al., 2009; RASOTTO et al., 2017; KIM et al., 2014).

Apesar das mamas abdominais caudais e inguinais serem as mais acometidas (YANG et al., 2006; NGUYEN et al., 2017), a maioria das cadelas apresenta mais de uma neoplasia mamária no momento da apresentação clínica (GOLDSCHMIDT, PEÑA e ZAPPULLI, 2017; SORENMO et al., 2009).

Cães sem raça definida (SRD) são mais acometidos por tumor mamário (SASSI et al., 2010; TONITI et al., 2009; YANG et al., 2006; MOHR et al., 2016; SPOERRI et al., 2015; CHANG et al., 2009). Dentre as raças acometidas estão: Poodle (SASSI et al., 2010; TONITI et al., 2009; CHANG et al., 2009; KIM et al., 2016), Yorshire Terrier (SASSI et al., 2010; MOHR et al., 2016; RASOTTO et al., 2017; KIM et al., 2016), Pastor Alemão (SASSI et al., 2010; MOHR et al., 2016; RASOTTO et al., 2017),

Daschund (SASSI et al., 2010; MOHR et al., 2016; SPOERRI et al., 2015), Maltês (YANG et al., 2006; CHANG et al., 2009; KIM et al., 2016), Shi Tzu (TONITI et al., 2009; KIM et al., 2016), Cocker Spaniel (MOHR et al., 2016; KIM et al., 2016), Boxer (SPOERRI et al., 2015), Pomeranian (CHANG et al., 2009), Pointer (SASSI et al., 2010) demonstrando que as raças de pequeno porte são mais acometidas.

2.1.2 Fatores prognósticos

O tamanho tumoral é um fator prognóstico independente, sendo forte preditor de recidiva local, metástase à distância e de sobrevida (RASOTTO et al., 2017). Por isso, os tumores grandes ($> 3\text{-}5$ cm de diâmetro) são mais comumente malignos, enquanto que os menores de um cm de diâmetro são mais propensos a serem benignos (GOLDSCHMIDT, PEÑA e ZAPPULLI, 2017).

Outro importante fator prognóstico é o grau histológico da neoplasia, em que carcinomas de grau III possuem risco de morte sete vezes maior, quando comparado aos de grau I (RASOTTO et al., 2017).

Carcinomas e mioepiteliomas malignos são mais agressivos que carcinomas complexos e carcinomas em tumor misto benigno, sendo que este último apresenta comportamento semelhante a tumores benignos: sem recidiva, sem metástase distante e com sobrevida longa, obtendo excelente prognóstico (RASOTTO et al., 2012; RASOTTO et al., 2017).

Alguns fatores prognósticos do carcinoma mamário invasor são importantes para a cadelas e para a mulher, como o tamanho do tumor, o estágio da doença, invasão linfovascular, grau histológico e receptor de estrógeno (VAN DE VIJVER, 2014; NGUYEN et al., 2017).

Metástase para linfonodo regional e órgãos distantes está intrinsecamente relacionado ao tipo histológico e grau do tumor, sendo os de grau III mais frequentes. Carcinoma adenoescamoso, comedocarcinoma e carcinoma sólido tiveram prognósticos ruins, sendo que o primeiro obteve a maior taxa de recidiva. Os tipos histológicos mais desfavoráveis foram carcinoma anaplásico e carcinossarcoma, com ambos apresentando sobrevida de apenas três meses e 100% de taxa metastática para o carcinossarcoma (PEÑA et al., 2013; RASOTTO et al., 2017).

Estudo prévio com cadelas apresentando carcinoma mamário invasor relata que o risco de metástase à distância foi de 17% no primeiro ano e 24% no segundo ano, após

o diagnóstico, valor este que pode variar diante do não acompanhamento adequado, por questões financeiras do proprietário (NGUYEN et al., 2017).

É possível diferenciar carcinomas mamários caninos metastáticos de carcinomas não-metastáticos por meio dos perfis de expressão gênica, uma vez que os carcinomas que disseminaram para linfonodos demonstraram perfil de expressão gênico relacionado a aumento da progressão do ciclo celular, diferenciação celular alterada e diminuição da sinalização do fator de crescimento, além de diversos moduladores de matriz e genes de adesão celular apresentarem expressão alterada nas células neoplásicas metastáticas. Isso possibilita uma previsão do comportamento clínico, podendo ser utilizada para novas pesquisas moleculares e potenciais alvos terapêuticos (KLOPFLEISCH et al., 2010).

2.1.3 Diagnóstico

O exame histopatológico é considerado o padrão ouro para o diagnóstico de tumores mamários. Com base em artigos prévios sobre morfologia das neoplasias mamárias caninas, a Organização Mundial da Saúde, em 1974, propôs um sistema de classificação histológica (HAMPE e MISDORP, 1974), o qual foi modificado em 1999 (MISDORP et al., 1999).

Como vários novos subtipos histológicos de neoplasias mamárias foram descritas após a segunda classificação, em 2011, Goldschmidt e colaboradores comparando os dois sistemas de graduação para carcinomas mamários caninos e felinos propuseram um novo sistema de classificação, os quais acrescentaram algumas variantes malignas de neoplasias benignas já descritas, alteraram algumas nomenclaturas, além de adicionarem novos subtipos histológicos (GOLDSCHMIDT et al., 2011).

No Brasil, diversos patologistas e oncologistas se reuniram durante o I Encontro de Patologia Mamária em 2010 e também elaboraram um consenso evidenciando critérios que auxiliam no diagnóstico, prognóstico e tratamento de neoplasias mamárias em cadelas (CASSALI et al., 2011).

Um sistema preconizado de classificação é uma importante ferramenta prognóstica, facilitando a interpretação histológica e fornecendo critérios uniformes para os patologistas veterinários (PEÑA et al., 2013; RASOTTO et al., 2012), já que invasão e graduação das neoplasias são importantes fatores prognósticos (SASSI et al., 2010).

Os critérios histológicos de malignidade determinam o comportamento biológico dos tumores mamários. RASOTTO et al. (2017) propuseram que para ser considerado

maligno o tumor deve apresentar pelo menos um dos seguintes critérios: possuir mais de três camadas de estratificação epitelial, áreas de necrose distribuídas aleatoriamente, acentuado pleomorfismo nuclear nas áreas de maior grau de anisocariose e mais de três mitoses em 10 campos de maior aumento, nas áreas com maior atividade mitótica. Estes autores empregaram estes critérios e verificaram correlação entre recidiva e sobrevida, visto que todas as cadelas com tumores classificados como benignos não tiveram recidivas e não estavam relacionados com a morte do animal.

Carcinoma complexo é um dos tipos histológicos mais frequentes, seguido pelos carcinomas simples, subtipo tubulopapilar (SASSI et al., 2010; YANG et al., 2006; NGUYEN et al., 2017; CHANG et al., 2009; SPOERRI et al., 2015; RASOTTO et al., 2017; KIM et al., 2014).

2.2 Tratamento de neoplasias mamárias

A mastectomia com amplas margens é o tratamento para tumores mamários, a qual pode ser regional, total, unilateral ou bilateral dependendo da disseminação do tumor (WHITE, 2003). Caso esteja no início da doença, o procedimento cirúrgico pode obter cura, porém em estágios mais avançados, a ocorrência de metástase é muito comum (KURZMAN e GILBERTSON, 1986).

A mastectomia total é o procedimento cirúrgico mais indicado, uma vez que a maioria das cadelas (58%) desenvolve novo nódulo na cadeia ipsilateral quando opta apenas pela retirada local do tumor (STRATMANN et al., 2008).

A quimioterapia é indicada, mesmo sem evidências de metástase, quando a cadelha é diagnosticada com um dos tipos histológicos: sólido, micropapilar, anaplásico e carcinossarcoma, além de pacientes com metástase, independente do tipo histológico da neoplasia (CASSALI et al., 2011).

O ano posterior ao término da quimioterapia, o animal deve ser avaliado trimestralmente e semestralmente no segundo ano até completar dois anos pós tratamento (CASSALI et al., 2011).

2.3 Receptor de estrógeno (RE) na glândula mamária

É importante conhecer e avaliar a síntese e catabolismo do estrógeno, bem como a sensibilidade do tecido a este hormônio, diante da estreita relação entre o risco de câncer de mama e a exposição a esse hormônio (CLEMONS e GOSS, 2001).

Já se sabe que os estrógenos são mediadores da regulação da expressão gênica, exercendo diversas funções importantes em células normais e cancerígenas. O metabolismo oxidativo do estrógeno resulta em moléculas que são potentes compostos genotóxicos, os quais podem iniciar mutações genéticas, por produzirem radicais livres e espécie reativa de oxigênio (ROS). Vários estudos identificam os estrógenos como agentes cancerígenos, realizando o crescimento de células epiteliais e atuando como precursores de metabólitos de estrógenos mutagênicos. Estes aumentam a chance de erros genéticos, por estimularem a multiplicação de células epiteliais da glândula mamária e aumentarem a replicação de células portadoras de mutações potencialmente oncogênicas (CAVALIERI et al., 2000; YAGER, 2000; DICKSON e STANCEL, 1999; FEIGELSON e HENDERSON, 1996; KEY et al. 2011; YAGER e DAVIDSON, 2006).

Além disso, os metabólitos do estrógeno podem mediar o seu efeito com ativação do receptor de estrógeno clássico, interação com outros receptores, ligação direta ao DNA ou por outros mecanismos, como a quebra da cadeia dupla do DNA (ZHU e CONNEY, 1998; WILLIAMSON e LEES-MILLER, 2011).

Os receptores de estrógeno e progesterona são rotineiramente utilizados, nos tumores de mama das mulheres, como marcadores prognósticos e preditivos de resposta ao tratamento endócrino (HAMMOND et al., 2010). No caso de carcinomas mamários em cadelas a realidade é diferente (NIETO et al., 2000) e apesar do grande número de estudos sobre receptores hormonais em neoplasias mamárias de cadelas, ainda não é possível estabelecer uma comparação entre as pesquisas, visto a diversidade de formas de avaliação entre os pesquisadores (PEÑA et al, 2014).

Segundo Queiroga e colaboradores (2005), tanto a prolactina como os hormônios esteroides podem exercer um papel autócrino/parácrino na manutenção do tumor de mama nas cadelas, além de estarem ligados ao crescimento desta doença.

A glândula mamária canina por ser um órgão hormônio-dependente sofre atividade cíclica com fases de desenvolvimento e regressão consecutivas, que diferem entre as glândulas e também dentro de cada glândula (REHM, STANISLAUS e WILLIAMS, 2007; SANTOS, MARCOS e FAUSTINO, 2010).

O número de ER na glândula mamária é baixo durante o proestro até o início do diestro, tendo pico no meio de diestro e voltam a níveis baixos novamente durante o anestro. Enquanto que a concentração de receptores de progesterona é menor, mas ligeiramente maior do que a do estrógeno, durante proestro e estro, porém aumenta e tem

pico em paralelo ao ER no meio do diestro, permanecendo elevado até o anestro (DONNAY et al., 1995).

Antes do primeiro ciclo estral, apenas alguns ductos podem ser observados na derme do mamilo (REHM, STANISLAUS e WILLIAMS, 2007). O estrógeno influencia a proliferação do sistema de dutos mamários na puberdade e a progesterona está relacionada com desenvolvimento dos alvéolos. Receptores de estrógeno e progesterona são expressos durante ciclo estral e são regulados por hormônios esteróides (TONITI et al., 2009).

A influência do estrógeno sobre a carcinogênese mamária em cadelas pode ser evidenciada pelo efeito protetor da castração precoce. A incidência de neoplasia mamária em fêmeas caninas castradas antes do primeiro cio é de 0,05%, mas aumenta para 8% ou 26% se castradas após o primeiro e segundo cio, respectivamente. Animal que é castrado após o segundo cio tem o mesmo risco de desenvolvimento de tumores malignos que cadelas não castradas (SCHNEIDER et al., 1969).

Estudo concluiu que nem todos os cães com neoplasia mamária maligna se beneficiam da castração no momento da mastectomia. A OSH no momento da mastectomia foi válida em animais com neoplasias graduadas em II, receptor de estrógeno positivo e/ou com aumento sérico de estrógeno. Isso indica que a concentração sérica do estrógeno pode ser usada como um marcador para identificar animais que se beneficiam da castração, no momento da mastectomia (KRISTIANSEN et al., 2016; QUEIROGA et al., 2005).

Glândulas mamárias normais de cadelas expressam receptores de estrógeno, porém esta expressão decresce progressivamente em hiperplasias e tumores malignos (GOLDSCHMIDT, PEÑA e ZAPPULLI, 2017). Nas mulheres, após vários estudos clínicos randomizados, confirmou-se que não há benefício em terapia endócrina nos casos de câncer de mama invasivo ER negativo (HAMMOND et al., 2010).

Mulheres em pós-menopausa apresentam 29% a mais de chance de desenvolverem tumor de mama, quando apresentam altas concentrações de estradiol sérico (THOMAS et al., 1997). Além disso, em mulheres há associação do tumor de mama com menarca precoce, gravidez tardia e menopausa tardia, bem como o risco reduzido associado à menopausa precoce (PAFFENBARGER, KAMPERT e CHANG, 1980; ROSNER e COLDITZ, 1996).

Tumores malignos de cadelas que apresentam pseudociese expressam mais receptores de estrógeno (NIETO et al., 2000). Já MOHR e colaboradores (2016) não

observaram diferença entre a expressão de receptores hormonais com o fato de a cadela ser castrada ou não.

Diversos estudos com neoplasias mamárias caninas avaliaram a imunomarcação para estrógeno por meio da IHQ e verificaram maior expressão de estrógeno nos tumores benignos quando comparado aos tumores malignos (YANG et al., 2006; MOHR et al., 2016).

Na técnica de IHQ a marcação de receptor de estrógeno é localizada na área nuclear das células epiteliais, mas varia em relação ao número de células positivas e à intensidade do produto da reação, em glândulas mamárias normais e neoplásicas. Células mioepiteliais podem ser positivas ou negativas e, as células do estroma, tanto de glândula mamária normal como neoplásica, assim como condrócitos e osteócitos em tumores mistos, são negativas (GOLDSCHMIDT, PEÑA e ZAPPULLI, 2017).

Em geral, como controle positivo para receptores de estrógeno na técnica de IHQ são utilizados: ovário normal, útero e glândula mamária, onde há marcação nuclear das células da granulosa e células intersticiais do ovário, células epiteliais mucosas, fibrócitos estromais e células musculares lisas dos cornos uterinos e células epiteliais da glândula mamária (CHANG et al., 2009).

Existem várias formas de avaliação da imunomarcação de receptores de estrógeno, sendo que vários autores indicam como ponto de corte para positividade na técnica de IHQ a expressão em mais de 10% dos núcleos das células epiteliais, observando toda área neoplásica (PEÑA et al., 2014; KIM et al., 2014; GAMA, ALVES e SCHMITT, 2008). Outra forma de avaliação é através de escores, sendo considerado negativo o tumor que expressar <5% de células epiteliais marcadas; + (expressão leve) de 5–19%; ++ (moderada) 20–59%; e +++ (alta) >60% (YANG et al., 2006).

Kristiansen et al. (2016) utilizaram como método de avaliação de imunomarcação a determinação de escore total, considerando porcentagem de células marcadas mais a intensidade de marcação. Com a porcentagem de células marcadas sendo classificada entre 0 e 5 (nenhuma marcação = 0; <1% de células marcadas = 1; 1-10% = 2; 10-33% = 3; 33- 66% = 4; 66-100% = 5) e a intensidade de coloração em: ausente = 0, fraco = 1, moderado = 2 e forte = 3. A pontuação total é igual a 0 ou varia de 2 a 8.

Embora a técnica de IHQ seja muito utilizada, a comparação de resultados entre os diversos estudos é difícil, principalmente pelo uso de diferentes anticorpos primários,

várias formas de interpretação dos resultados e pela seleção das amostras (PEÑA et al., 2014; GAMA, ALVES e SCHMITT, 2008).

Receptores de estrógeno em cadelas e gatas exibem maior imunomarcação em tecidos mamários normais, com hiperplasia/displasia e tumores benignos quando comparado aos carcinomas. Na comparação entre as duas espécies, carcinomas mamários de gatas tiveram menor expressão de estrógeno. Porém, em ambas as espécies, a expressão hormonal em carcinomas invasivos não teve correlação com tipo histológico ou tempo de sobrevivência (MILLANTA et al., 2005).

Estudo comparando expressão de receptores hormonais em amostras frescas congeladas e em blocos de parafina utilizando a técnica de ensaio multiplex detectou menor expressão de estrógeno nas neoplasias mamárias malignas. Quanto aos subtipos histológicos, carcinoma sólido, carcinoma ductal e carcinoma anaplásico foram aqueles de menor expressão, quando comparado ao tecido mamário não neoplásico fresco congelado e a hiperplasia lobular mamária em tecido de parafina. Além disso, verificou que os carcinomas tubulares simples, carcinoma complexo, mioepitelioma maligno e carcinoma papilar intraductal de amostras emblocadas tiveram menor expressão de receptor de estrógeno do que o grupo de hiperplasia lobular (MOHR et al., 2016). Dentre os carcinomas, Chang et al. (2009) verificaram que carcinomas complexos tiveram maior expressão de estrógeno do que carcinomas simples e sarcomas.

Os tumores benignos (adenomas simples e complexos), assim como os carcinomas tubulares simples tiveram uma maior expressão de receptor de estrógeno, enquanto que os outros subtipos de carcinoma (sólido, anaplásico e comedocarcinoma) e mioepiteliomas malignos tiveram expressão fraca, segundo Wan et al. (2014). Estes autores também relataram que a expressão do receptor foi maior em tumores benignos em relação aos malignos e significativamente menor nas cadelas castradas quando comparada às não castradas.

Na avaliação da expressão de ER em carcinomas mamários inflamatórios (100% negativo) e tumores mamários malignos (90% negativo) verificou-se que a expressão é semelhante (ILLERA et al., 2006).

Quanto à associação entre expressão de receptores de estrógeno e outras variáveis clinicopatológicas, Toniti et al. (2009) não verificaram associação entre a quantidade de receptores hormonais e as principais raças (Dachshund, Terrier, Cocker Spaniel, German Shepherd) e o subtipo histológico. Já Mainenti et al. (2014) relataram que cadelas com <10% de células imunomarcadas para estrógeno e progesterona

apresentaram pior prognóstico, além de invasão linfática, maior quantidade de mitose, tumores de maior tamanho e maior grau histológico. Da mesma maneira, cães com tumores malignos de baixa graduação e sem metástase em linfonodo ou a distância apresentaram significativamente maiores expressões de receptores de estrógeno (CHANG et al., 2009).

Tumores que expressam tanto ER quanto de progesterona estão associados a um maior período livre da doença e apresentam maiores taxas de sobrevivência quando comparados com outros fenótipos (DE LAS MULAS, MILLAN e DIOS, 2005; CHANG et al., 2009).

2.4 Catecol-metil-transferase (COMT)

Os estrógenos de catecol, metabólitos de estrogênio, são alvos de estudos como possíveis influenciadores no desenvolvimento do câncer de mama, visto que a exposição ao estrogênio já está bem estabelecida como um dos principais fatores de risco para este tipo de neoplasia. A *Catecol-O-Metiltransferase (COMT)* é uma enzima de fase II que inativa o estrogênio catecol por metilação, o qual é potencialmente carcinogênico, uma vez que podem ser oxidados em intermediários quinona / semiquinona reativos capazes de formarem radicais livres ou por formarem diretamente adutos de DNA. Em humanos, o gene que codifica a proteína *COMT* contém um polimorfismo de nucleotídeo único, que influencia na capacidade de atividade da enzima (BERGMAN-JUNGESTRÖM e WINGREN, 2001; LIN et al., 2005; LAJIN et al., 2013; MITRUNEN e HIRVONEN, 2003; LEMON e GON, 2001; DUNNING et al., 1999).

A produção e o catabolismo do estrógeno estão sumarizados na Figura 1. As reações de hidroxilação são as principais formas de catabolização do estrógeno, resultando em componentes carcinogênicos, como 4-hidroxiestrona e 16 α-hidroxiestradiol. Os metabólitos 2-hidroxi e 4-hidroxi são transformados em metabólitos metoxilados anticarcinogênicos pela enzima *catechol-O-metiltransferase*, sendo esta considerada importante na inativação de metabólitos de estrogênio cancerígenos, reduzindo o potencial de dano mutagênico (LEMON e GON, 2001; PEREIRA et al., 2008; YAGER e LIEHR, 1996).

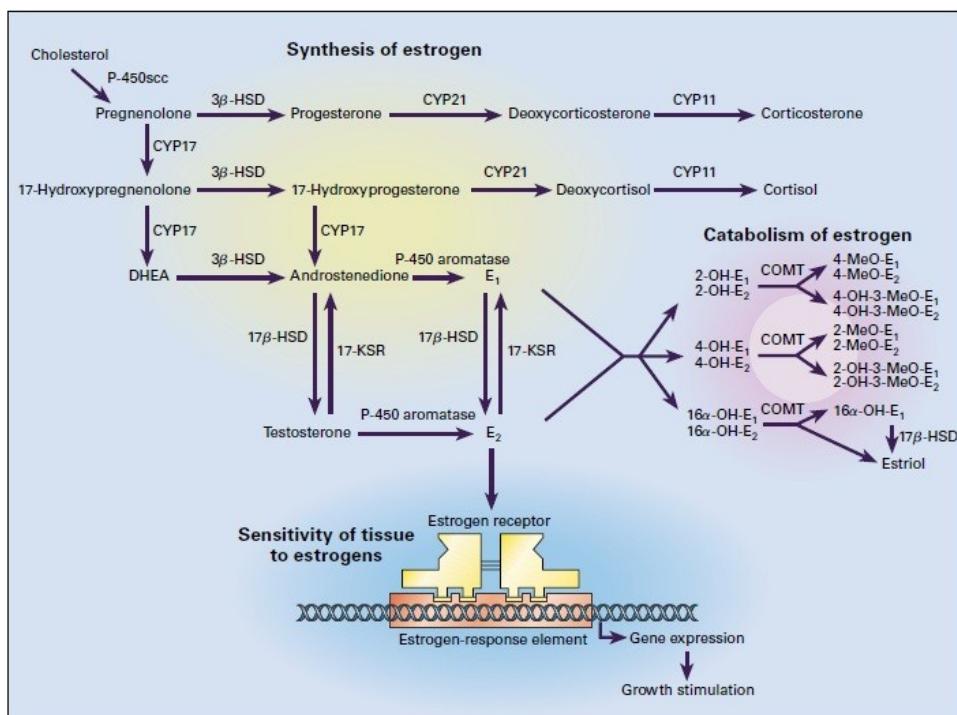


Figura 1. Produção e catabolismo do estrógeno. Fonte: CLEMONS e GOSS, 2001.

O 2-metoxiestradiol (2-MeOE2), derivado da ação da *COMT*, inibe a proliferação de células neoplásicas da glândula mamária por interferir na função dos microtúbulos, induzir apoptose e inibir a angiogênese. *In vivo*, foi demonstrado em camundongos inoculados com linhagem de tumor mamário humano que a administração de 75 mg/kg de 2-MeOE2, via oral, por um mês levou à supressão do crescimento de câncer de mama humano em 60% dos camundongos, sem demonstração de toxicidade (KLAUBER et al., 1997).

Sabe-se que os genes que regulam a formação e catabolismo do estrógeno, por meio da transcrição e tradução, podem influenciar na suscetibilidade à neoplasia mamária, uma vez que contribuem para a função do estrógeno (QIN et al., 2012).

Lavigne e colaboradores (1997) foram pioneiros em evidenciar experimentalmente a relação da baixa atividade da enzima *COMT* com desenvolvimento de neoplasias mamárias em mulheres. Estes autores demonstraram que mulheres que possuem o alelo que codifica a *COMT* de baixa atividade apresentam riscos significativamente maiores de desenvolvimento da neoplasia quando associado ao período pós-menopausa e índice de massa corporal $> 24,47 \text{ kg/m}^2$ (LAVIGNE et al., 1997; THOMPSON et al., 1998).

Porém, há resultados controversos quanto à influência do polimorfismo sobre câncer de mama em mulheres. Estudos utilizando grandes números amostrais, incluindo mulheres brancas e mulheres com descendência africana, de diferentes idades, não observaram associação entre uma ou mais cópias do alelo *COMT* de baixa atividade e o risco de câncer de mama, sugerindo que o genótipo *COMT* não está relacionado ao risco de câncer de mama (MILIKAN et al., 1998; PEREIRA et al., 2008; WEN et al., 2005).

Em estudo de meta-análise utilizando 51 pesquisas sobre a associação do polimorfismo do *COMT Val158Met* e aumento do risco de desenvolvimento de neoplasias mamárias em mulheres concluiu que apenas o polimorfismo não está associado ao risco de câncer de mama nas mulheres. Porém recomendam que sejam feitas avaliações considerando interações entre gene e ambiente, além de grandes estudos utilizando métodos de genotipagem, comparações entre mesmo tipo de câncer mamário e controles bem pareados, para que realmente seja comprovada a real associação do polimorfismo da enzima com o risco de desenvolvimento da neoplasia (QIN et al., 2012; PEREIRA et al., 2008).

Por outro lado, estudo de meta-análise sobre a relação dos tumores de mamas de mulheres chinesas com polimorfismo da enzima, concluíram que a variante *COMT Val158Met* contribue para a suscetibilidade ao câncer de mama na população chinesa, particularmente entre as mulheres na pré-menopausa. Os autores atribuem a susceptibilidade nesta fase ao fato da mulher ter estrógeno circulante elevado e, diante da baixa atividade enzimática, apresentam níveis altos de compostos de catecol de estradiol, os quais têm efeitos mutagênicos (WAN et al., 2014; THOMPSON et al., 1998).

O polimorfismo do *COMT* também foi relacionado com estágio clínico e à extensão da metástase em linfonodo regional no câncer de mama, sendo que 67% das mulheres com o alelo *COMT* de baixa atividade tinham metástase em linfonodo regional (MATSUI et al., 2000).

Há pesquisas que sugerem que a *COMT* é sensível a hormônios, demonstrando que estrógenos e a progesterona inibem a atividade da *COMT*, regulando negativamente a transcrição do seu gene em um processo mediado por receptores de estrogênio e progesterona (MILLANTA et al., 2005; SALAMA et al., 2007).

Em cães sabe-se que existe um polimorfismo de nucleotídeo único no gene da *COMT* (G482A), mas ainda existem poucos estudos sobre sua influência com o desenvolvimento de neoplasias mamárias. Em um estudo feito em 2008, com 90 cadelas com tumores mamários e 84 controles, não obteve associação significativa entre o

genótipo *COMT*, os parâmetros clinicopatológicos (idade e peso do cão, número e tipo histológico das lesões e metástase) e o risco global de desenvolver tumor mamário, porém encontraram um efeito protetor do polimorfismo na idade de início dos tumores mamários, onde cadelas portadoras do alelo variante tiveram uma probabilidade três vezes maior de desenvolver neoplasias mamárias após os nove anos de idade, em comparação com as cadelas não portadoras (PEREIRA et al., 2008).

Existe uma possível relação dos genótipos da *COMT* com as neoplasias mamárias no cão, já que cadelas que apresentaram variação no gene foram mais propensas a ter recidivas dos carcinomas mamários. Esse dado pode ser útil na seleção da abordagem cirúrgica, podendo utilizá-lo como fator genético preditivo de recorrência, onde cadelas portadoras de polimorfismo da *COMT* podem ser indicadas para mastectomia radical ao invés de regional (PEREIRA et al., 2009).

Estudando genótipos em diferentes raças caninas e a frequencia alélica de regiões de polimorfismo do *COMT* identificou-se três polimorfismos de nucleotídeo simples (SNP): G39A, G216A e G482A, sendo que o G482A obteve frequência de 90,2% para o alelo G e 9,8% para o alelo A em um grupo de 266 animais de cinco raças de cães (Golden Retrievers, Labrador Retrievers, Maltês, Schnauzer miniatura e Shiba). Dentre os três genótipos, o G482A promove substituição de aminoácido de Guanina para Adenina. Nos humanos existe no exon 4 um polimorfismo de nucleotídeo simples (G322A), que substitui o aminoácido Valina por Metionina, alterando o nível de atividade da enzima. Como o SNP identificado de G482A não estava localizado na mesma região que em humanos, ele pode afetar as ligações dos substratos ou pode mudar estruturalmente o produto de aminoácido, assim como ocorre nos humanos (MASUDA et al., 2004).

O pequeno número amostral, em algumas pesquisas, pode ser uma possível explicação para a discrepância entre os resultados dos estudos sobre a enzima *COMT* (WEN et al., 2005).

A relação da expressão de ER com o polimorfismo da enzima *COMT* em neoplasias mamárias de cadelas ainda não foi demonstrada e necessita de estudos. Por isso, o presente trabalho teve como objetivo principal avaliar esta correlação, além de avaliar a relação do polimorfismo da enzima *COMT* com variáveis clinicopatológicas, como tipo histológico, presença de metástase e idade de surgimento da neoplasia mamária em cadelas.

REFERÊNCIAS:

BERGMAN-JUNGESTRÖM, M.; WINGREN, S. Catechol-O-Methyltransferase (*COMT*) gene polymorphism and breast cancer risk in young women. **British Journal of Cancer**, v. 85, n. 6, p. 859–862, fev./jul. 2001.

<https://doi.org/10.1054/bjoc.2001.2009>

CASSALI, G.D. et al. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.4, n.2, p.153-180. Jun. 2011.

CAVALIERI, E. et al. Oestrogens as endogenous genotoxic agents – DNA adducts and mutations. **Journal of the National Cancer Institute Monograph**, v. 27, p. 75–93. 2000.

<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jncimonographs.a024247>

CHANG, C.-C. et al. Evaluation of hormone receptor expression for use in predicting survival of female dogs with malignant mammary gland tumors. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 235, n. 4, p. 391-396, Ago. 2009.

<https://doi.org/10.2460/javma.235.4.391>

CLEMONS, M.; GOSS, P. Estrogen and the risk of breast cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 4, Jan. 2001.

<https://doi.org/10.1056/NEJM200101253440407>

DE LAS MULAS, J. M.; MILLAN, Y.; DIOS, R. A Prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor alpha and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. **Veterinary Pathology**, v. 42, p. 200-212. 2005.

<https://doi.org/10.1354/vp.42-2-200>

DICKSON, R. B.; STANCEL, G. M. Chapter 8: Estrogen Receptor-Mediated Processes in Normal and Cancer Cells. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, n. 27, p. 135-145. 1999.

<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jncimonographs.a024237>

DONNAY, I. et al. Changes in oestrogen, progesterone and epidermal growth factor receptor concentrations and af finities during the oestrous cycle in the normal mammary gland and uterus of dogs. **Veterinary Research Commun**, v. 19, n. 2, p. 101-113. 1995.

<https://doi.org/10.1007/BF01839276>

DUNNING, M. A. et al. A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, n. 8, p. 843–854, Out. 1999.

FEIGELSON, H. S.; HENDERSON, B. E. Estrogens and breast cancer. **Carcinogenesis** Lond, v. 17, n. 11, p. 2279-2284, Nov. 1996.
<https://doi.org/10.1093/carcin/17.11.2279>

GAMA, A.; ALVES, A.; SCHMITT, F. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. **Virchows Arch**, v. 453, p. 123–132, abr./ago. 2008.
<https://doi.org/10.1007/s00428-008-0644-3>

GOLDSCHMIDT, M. H.; PEÑA, L.; ZAPPULLI, V. Tumors of the Mammary Gland. In: Meuten DJ, ed. **Tumors in Domestic Animals**. 5th ed. Ames, IA: Iowa State Press; p. 723-766. 2017.

GOLDSCHMIDT, M. H. et al. Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v. 48, p. 117–131, Jan. 2011.
<https://doi.org/10.1177/0300985810393258>

HAMMOND, M. E. H. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 16, Jun. 2010.
<https://doi.org/10.1200/JOP.777003>

HAMPE, J. F.; MISDORP, W. Tumours and dysplasias of the mammary gland. **Bull World Health Organ** v. 50, p. 111–133. 1974.

ILLERA, J. C. et al. Steroids and receptors in canine mammary cancer. **Steroids**, v. 71, p. 541–548, nov./maio. 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2005.11.007>

KEY, T. et al. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, n. 8, p. 606–16, Abr. 2002.
<https://doi.org/10.1093/jnci/94.8.606>

KEY, T. J. et al. Circulating sex hormones and breast cancer risk factors in postmenopausal women: reanalysis of 13 studies. **British Journal of Cancer**, v. 105, n. 5, p. 709–722, Ago. 2011.
<https://doi.org/10.1038/bjc.2011.254>

KIM, H. W. et al. Breed- and age-related differences in canine mammary tumors. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 80, n. 2, p. 146-55, jun./out. 2016.

KIM, N.-H. et al. Evaluation of Clinicopathological Characteristics and Oestrogen Receptor Gene Expression in Oestrogen Receptor-negative, Progesterone Receptor-positive Canine Mammary Carcinomas. **Journal of Comparative Pathology**, v. 151, p. 42-50, Jul. 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2014.04.001>

KLAUBER, N. et al. Inhibition of Angiogenesis and Breast Cancer in Mice by the Microtubule Inhibitors 2-Methoxyestradiol and Taxol. **Cancer Research**, n. 57, p. 81-86, Jan. 1997.

KLOPFLEISCH, R. et al. Metastatic canine mammary carcinomas can be identified by a gene expression profile that partly overlaps with human breast cancer profiles. **BMC Cancer**, v. 10, p. 618, Nov. 2010.

<https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-618>

KRISTIANSEN, V. M. et al. Effect of Ovariohysterectomy at the Time of Tumor Removal in Dogs with Mammary Carcinomas: A Randomized Controlled Trial. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 30, n.1, p. 230–241, jan./fev. 2016.
<https://doi.org/10.1111/jvim.13812>

KURZMAN, I. D.; GILBERTSON, S. R. Prognostic factors in canine mammary tumors. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)**, v. 1, n. 1, p. 25-32, Fev. 1986.

LAJIN, B. et al. Catechol-O-methyltransferase Val 108/158 Met polymorphism and breast cancer risk: a case control study in Syria. **Breast Cancer**, v. 20, p. 62–66, Jan. 2013.

<https://doi.org/10.1007/s12282-011-0309-y>

LAVIGNE, J. A. et al. An Association between the Allele Coding for a Low Activity Variant of Catechol-0-methyltransferase and the Risk for Breast Cancer. **Cancer Research**, v. 57, p. 5493-5497, Dez. 1997.

LEMONS, M. C.; GOSS, P. Estrogen and the risk of breast cancer. **The New England Journal of Medicine**, n. 4, Jan. 2001.

<https://doi.org/10.1056/NEJM200101253440407>

LIM, V. W. et al. Serum estrogen receptor bioactivity and breast cancer risk among postmenopausal women. **Endocrine Related Cancer**, v. 21, n. 2, p. 263–73, Fev. 2014.
<https://doi.org/10.1530/ERC-13-0233>

LIN, W.-Y. et al. Polymorphic catechol-O-methyltransferase gene, duration of estrogen exposure, and breast cancer risk: A nested case-control study in Taiwan. **Cancer**

Detection and Prevention, v. 29, p. 427–432, Set. 2005.
<https://doi.org/10.1016/j.cdp.2005.07.003>

MAINENTI, M. et al. Oestrogen and progesterone receptor expression in subtypes of canine mammary tumours in intact and ovariectomised dogs. **The Veterinary Journal**, v. 202, p. 62–68, Out. 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.06.003>

MASUDA, K. et al. Breed differences in genotype and allele frequency of catechol O-methyltransferase gene polymorphic regions in dogs. **Journal Veterinary Medicine Science**, v. 66, n. 2, p. 183-187, Fev. 2004.

<https://doi.org/10.1292/jvms.66.183>

MATSUI, A. et al. Progression of human breast cancers to the metastatic state is linked to genotypes of catechol-O-methyltransferase. **Cancer Letters**, v. 150, n.1, p. 23-31, Mar. 2000.

[https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(99\)00368-7](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(99)00368-7)

MILIKAN, R. C. et al. Catechol- O-methyltransferase and breast cancer risk. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 11, p. 1943-1947, Nov. 1998.

<https://doi.org/10.1093/carcin/19.11.1943>

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

<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.02.002>

MISDORP, W. et al. Histologic Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat, 2nd ser., v. 7. **Armed Force Institute of Pathology and World Health Organization**, Washington, DC. 1999.

MITRUNEN, K.; HIRVONEN, A. Molecular epidemiology of sporadic breast cancer: the role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. **Mutation Research**, v. 544, n. 1, p. 9-41, Set. 2003.

[https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(03\)00016-4](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(03)00016-4)

MOE, L. Population-based incidence of mammary tumours in some dogs breeds. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 57, p. 439–443. 2001.

MOHR, A. et al. Hormone Receptor Expression Analyses in Neoplastic and Non-Neoplastic Canine Mammary Tissue by a Bead Based Multiplex Branched DNA Assay: A Gene Expression Study in Fresh Frozen and Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Samples. **PLoS One**, v. 11, n. 9, Set. 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163311>

NGUYEN, F. et al. Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 1: natural history and prognostic factors. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 167, n. 3, p. 635-648, Fev. 2017.
<https://doi.org/10.1007/s10549-017-4548-2>

NIETO, A. et al. Immunohistologic Detection of Estrogen Receptor Alpha in Canine Mammary Tumors: Clinical and Pathologic Associations and Prognostic Significance. **Veterinary Pathology**, v. 37, n. 3, p. 239–247, Maio. 2000.
<https://doi.org/10.1354/vp.37-3-239>

PAFFENBARGER R. S. JR; KAMPERT, J. B.; CHANG, H. G. Characteristics that predict risk of breast cancer before and after menopause. **American Journal of Epidemiology**, v. 112, n. 2, p. 258-68, Ago. 1980.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a112992>

PEÑA, L. et al. Canine Mammary Tumors: A Review and Consensus of Standard Guidelines on Epithelial and Myoepithelial Phenotype Markers, HER2, and Hormone Receptor Assessment Using Immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 1, p. 127-145, Jan. 2014.
<https://doi.org/10.1177/0300985813509388>

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, jan./jun. 2013.

<https://doi.org/10.1177/0300985812447830>

PEREIRA, P. D. et al. Estrogens Metabolism Associated with polymorphisms: Influence of *COMT* G482a Genotype on Age at Onset of Canine Mammary Tumors. **Veterinary Pathology**, v. 45, p. 124–130, Mar. 2008.

<https://doi.org/10.1354/vp.45-2-124>

PEREIRA, P. D. et al. Influence of Catechol-O-Methyltransferase (*COMT*) Genotypes on the Prognosis of Canine Mammary Tumors. **Veterinary Pathology**, v. 46, p. 1270–1274, Nov. 2009.

<https://doi.org/10.1354/vp.08-VP-0298-D-FL>

QIN, X. et al. Association of *COMT* Val158Met polymorphism and breast cancer risk: an updated meta-analysis. **Diagnostic Pathology**, v. 7, p. 136, Out. 2012.
<https://doi.org/10.1186/1746-1596-7-136>

QUEIROGA, F. L. et al. Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 94 p. 181–187, Fev. 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.12.014>

RASOTTO R. et al. A Retrospective Study of Those Histopathologic Parameters Predictive of Invasion of the Lymphatic System by Canine Mammary Carcinomas. **Veterinary Pathology**, v. 49, n. 2, p. 330-340, mar./jun. 2012.

<https://doi.org/10.1177/0300985811409253>

RASOTTO, R. et al. Prognostic Significance of Canine Mammary Tumor Histologic Subtypes: An Observational Cohort Study of 229 Cases. **Veterinary Pathology**, v. 54, n. 4, p. 571-578, Jul. 2017.

<https://doi.org/10.1177/0300985817698208>

REHM, S.; STANISLAUS, D. J.; WILLIAMS, A. M. Estrous cycle-dependent histology and review of sex steroid receptor expression in dog reproductive tissues and mammary gland and associated hormone levels. Birth Defects Research. Part B, **Developmental and Reproductive Toxicology**. v. 80, n. 3, p. 233–245, Jun. 2007.
<https://doi.org/10.1002/bdrb.20121>

ROSNER, B.; COLDITZ, G. A. Nurses' Health Study: log-incidence mathematical model of breast cancer incidence. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 88, n. 6, p. 359-64, Mar. 1996.

<https://doi.org/10.1093/jnci/88.6.359>

SALAMA S. et al. Progesterone regulates catechol-O-methyl transferase gene expression in breast cancer cells: distinct effect of progesterone receptor isoforms. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 107, n.3-5, p. 253–261, Jun. 2007.
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2007.03.049>

SANTOS, M.; MARCOS, R.; FAUSTINO, A.M.R. Histological study of canine mammary gland during the oestrous cycle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 5, p. 146–154, Out. 2010.

<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01536.x>

SANTOS, M. et al. Nuclear pleomorphism: Role in grading and prognosis of canine mammary carcinomas. **The Veterinary Journal**, n. 200, v. 3, p. 426–433, Jun. 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.03.019>

SASSI, F. et al. Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. **BMC Veterinary Research**, v. 6, n. 5, Jan. 2010.
<https://doi.org/10.1186/1746-6148-6-5>

SCHNEIDER, R.; DORN, C. R.; TAYLOR, D. O. N. Factores influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 43, n. 6, p. 1249–1261, Dez. 1969.
<https://doi.org/10.1093/jnci/43.6.1249>

SORENMO, K. U. et al. Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 7, n. 3, p. 162–172, Set. 2009.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2009.00184.x>

SPOERRI, M. et al. Endocrine control of canine mammary neoplasms: serum reproductive hormone levels and tissue expression of steroid hormone, prolactin and growth hormone receptors. **BMC Veterinary Research**, v. 11, p. 235, maio./set. 2015.
<https://doi.org/10.1186/s12917-015-0546-y>

STRATMANN, N. et al. Mammary tumor recurrence in bitches after regional mastectomy. **Veterinary Surgery**, v. 37, n. 1, p.82-86, Jan. 2008.
<https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.2007.00351.x>

THOMAS, H. V. et al. A prospective study of endogenous serum hormone concentrations and breast cancer risk in post-menopausal women on the island of Guernsey. **British Journal of Cancer**, v. 76, n. 3, p. 401-5. 1997.
<https://doi.org/10.1038/bjc.1997.398>

THOMPSON, P. A. et al. Genetic Polymorphisms in Catechol-0-Methyltransferase, Menopausal Status, and Breast Cancer Risk. **Cancer Research**, v. 58, p. 2107-2110, Maio. 1998.

TONITI, W. et al. Immunohistochemical Determination of Estrogen and Progesterone Receptors in Canine Mammary Tumors. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 10, n. 5, p. 907-11. 2009.

TRAVIS, R. C.; KEY, T. J. Oestrogen exposure and breast cancer risk. **Breast Cancer Research**, v. 5, n. 5, p. 239–47, Jul. 2003.
<https://doi.org/10.1186/bcr628>

UVA, P. et al. Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. **BMC Genomics**, v. 10, p. 135, Mar. 2009.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-135>

VAN DE VIJVER, M. J. Molecular tests as prognostic factors in breast cancer. **Virchows Arch**, v. 464, n. 3, p. 283–291, Mar. 2014.
<https://doi.org/10.1007/s00428-014-1539-0>

WAN, G.-X. et al. The Catechol-O-Methyltransferase Val158Met Polymorphism Contributes to the Risk of Breast Cancer in the Chinese Population: An Updated Meta-Analysis. **Journal of Breast Cancer**, v. 17, n. 2, p. 149-156, Jun. 2014. <https://doi.org/10.4048/jbc.2014.17.2.149>

WEN, W. et al. Cytochrome P450 1B1 and Catechol-O-Methyltransferase Genetic Polymorphisms and Breast Cancer Risk in Chinese Women: Results from the Shanghai Breast Cancer Study and a Meta-analysis. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**. v. 14, n. 2, p. 329-335, Fev. 2005.

<https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-04-0392>

WHITE, R. A. S. Surgical Treatment of Specific Skin Disorders, p. 349-351. in: SLATER B.H.(ed.). **Text book of small animal surgery**. v. 1, 3 rd ed. W. B. Saunders, Philadelphia. 2003.

WILLIAMSON, L. M.; LEES-MILLER, S. P. Estrogen receptor α-mediated transcription induces cell cycle-dependent DNA double-strand breaks. **Carcinogenesis**, v. 32, n. 3, p. 279–285, Mar. 2011.

<https://doi.org/10.1093/carcin/bgq255>

YAGER, J. D.; LIEHR, J. G. Molecular Mechanisms Of Estrogen Carcinogenesis. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. n. 36, p. 203-32. 1996. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.36.040196.001223>

YAGER, J. D.; DAVIDSON, N. E. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. **The New England journal of medicine**, v. 354, n. 3, p. 270-82, Jan. 2006. <https://doi.org/10.1056/NEJMra050776>

YAGER, J. D. Endogenous oestrogens as carcinogens through metabolic activation. **Journal of the National Cancer Institute Monogram**, v. 27, p. 67–73. 2000. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jncimonographs.a024245>

YANG, W.-Y. et al. Proliferative Activity, Apoptosis and Expression of Oestrogen Receptor and Bcl-2 Oncoprotein in Canine Mammary Gland Tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 134, n. 1, p. 70–79, Jan. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2005.07.002>

ZHU, B. T.; CONNEY, A. H. Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 1, p. 1–27. 1998. <https://doi.org/10.1093/carcin/19.1.1>

CAPÍTULO 2 - ARTIGO

ARTIGO SER SUBMETIDO NA REVISTA:

VETERINARY AND COMPARATIVE ONCOLOGY

**POLIMORFISMO NO GENE DA ENZIMA *COMT* E SUA CORRELAÇÃO
COM EXPRESSÃO DE RECEPTOR DE ESTRÓGENO E VARIÁVEIS
CLINICOPATOLÓGICAS EM CADELAS COM NEOPLASIAS
MAMÁRIAS**

L.F. Magalhães¹; A.A. Medeiros-Ronchi¹; R.A. dos Santos²; G.M. Magalhães³;
E.A. Viscone¹; E.C. Guimarães⁴; A.S. Vilella²

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

² Departamento de Genética e Biologia Molecular, Faculdade de Biomedicina, Universidade de Franca (UNIFRAN), Franca, São Paulo, Brasil.

³ Departamento de Patologia Animal Instituto Federal Sul de Minas- Muzambinho, Muzambinho, Minas Gerais, Brasil.

⁴ Faculdade de Matemática, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

Correspondência: L.F. Magalhães. Departamento de Patologia Animal, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Av. Mato Grosso, n 3289, bloco 2S, Bairro Umuarama, CEP: 38405314, Uberlândia-MG. Email: larissafmagalhaes@yahoo.com.br

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias mamárias são as mais frequentes em fêmeas caninas, representando de 50 a 70% dos tumores em cadelas não castradas, especialmente nos países onde a ovariohisterectomia é infrequente.¹ Hormônios esteróides desempenham um importante papel na patogênese dos tumores mamários caninos, assim como se observa nas mulheres.²

Os estrógenos de catecol, metabólitos de estrogênio, são alvos de estudos como possíveis influenciadores no desenvolvimento do câncer de mama, visto que a exposição ao estrogênio já está bem estabelecida como um dos principais fatores de risco para este tipo de neoplasia.³

Um dos mecanismos de inativação de metabólitos carcinogênicos do estrógeno é por meio da enzima *Catecol-metil-transferase (COMT)*. Em humanos há um polimorfismo de nucleotídeo único no gene *COMT* (*COMT val158met*) que tem sido relacionado a uma maior chance de desenvolver câncer de mama, já que mulheres portadoras deste polimorfismo apresentam menor atividade desta enzima. Nos cães, já foi relatado polimorfismo de nucleotídeo único no gene *COMT* (*G482A*).⁴ Estes autores verificaram que cadelas acima de nove anos de idade e portadores do alelo A tinham três vezes maior chance de desenvolverem tumor de mama quando comparadas às cadelas não portadores deste alelo.⁴

O polimorfismo do *COMT* também foi relacionado com estágio clínico e à extensão da metástase em linfonodo regional no câncer de mama, sendo que 67% das mulheres com o alelo *COMT* de baixa atividade tinham metástase em linfonodo regional.⁵

O status do receptor de estrógeno de cada animal pode ser um fator determinante na influência do genótipo *COMT* no resultado de neoplasias mamárias e sua avaliação poderia ser uma estratégia útil para avaliar valor prognóstico do genótipo *COMT* em cadelas que expressam ou não receptor de estrógeno.⁶

Estudos com tumores mamários caninos (TMC) demonstraram que neoplasias benignas apresentam maior expressão para receptor de estrógeno quando comparados aos tumores malignos.^{7,8} E ainda, cadelas com <10% de células imunomarcadas para estrógeno e progesterona apresentam pior prognóstico, além de invasão linfática, maior quantidade de mitose, tumores de maior tamanho e maior graduação.⁹

Em cadelas, a relação da expressão de receptores de estrógeno (RE α) em neoplasias mamárias com o polimorfismo da enzima *COMT* ainda não foi demonstrada e necessita de estudos. Por isso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar esta correlação, além de verificar a relação do polimorfismo da enzima *COMT* com variáveis clinicopatológicas, como comportamento tumoral, tipo histológico e presença de metástase em linfonodo de cadelas com neoplasias mamárias.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais e obtenção das amostras

O estudo foi submetido à Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e aprovado (protocolo nº 007/17).

Foram utilizadas 59 cadelas, sendo 51 com neoplasias mamárias (grupo experimental - GE) e oito sem neoplasia mamária (grupo controle - GC). Foram considerados como critérios de inclusão no GE: ausência de qualquer outro tipo de neoplasia, cadelas não castradas, idade acima de cinco anos, sem distinção de raça e peso.

Amostras de sangue periférico foram coletadas por venopunção da jugular, em tubo estéril para coleta a vácuo com anticoagulante. O sangue total foi centrifugado para obtenção da papa leucocitária que foi armazenada em freezer a -80°C para posterior realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

As amostras de tecido mamário neoplásico (GE) foram coletadas durante procedimento cirúrgico (mastectomia). As amostras do GC foram coletadas de cadelas hígidas que foram submetidas à ovariohisterectomia eletiva, sem alterações

macroscópicas nas glândulas mamárias, sendo coletada apenas a mama inguinal direita. As coletas foram realizadas no Hospital Veterinário da UFU e no Hospital Veterinário da Universidade de Franca (UNIFRAN).

As amostras de tecido mamário, seja com neoplasia ou mamas sem alterações, foram fixadas em formol tamponado 10% e processadas rotineiramente para confecção de lâminas histológicas para avaliação histopatológica e imuno-histoquímica.

2.2 Avaliação histopatológica

Os cortes de tecido mamário foram corados em Hematoxilina e Eosina e os tumores classificados histologicamente.¹⁰ O grau histológico foi atribuído de acordo com o sistema Nottingham modificado.¹¹ Quando a cadela possuía mais de um nódulo neoplásico maligno, com tipos histológicos diferentes, considerou-se o tipo histológico mais agressivo.¹²

2.3 Imuno-histoquímica

Foram feitos cortes de cinco µm, desparafinizados em xanol, hidratados em séries crescentes de etanol e reidratados utilizando água destilada. Para a recuperação antigênica utilizou-se tampão citrato (pH 6,0), em panela de pressão, por 20 min. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com banho de água oxigenada e álcool metanol a 3%, durante 20 min, em temperatura ambiente e câmera escura. Anticorpo primário anti-RE α (H-184, sc-7207, lote #J1413, Santa Cruz Biotechnology[®]) policlonal, produzido em coelho foi diluído na concentração de 1/200 e colocado nas superfícies dos cortes, que foram incubados overnight por 18 horas. Este anticorpo foi validado para espécie canina conforme a bula. Como sistema de revelação utilizou-se anticorpo secundário biotinilado e estreptavidina peroxidase (kit LSAB - Dako[®]). As lâminas foram cuidadosamente lavadas com solução com PBS 1x, entre cada etapa. A reação foi revelada com cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB - Dako[®]) e as lâminas contra coradas com hematoxilina de Harris, desidratadas e montadas.

Como controle positivo utilizou-se útero de cadela, sem alteração, e para o controle negativo da reação substituiu-se o anticorpo primário por diluente de anticorpo. A amostra foi considerada positiva quando mais de 10% das células apresentaram marcação nuclear.¹³

2.4 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído da fração de células brancas do sangue usando o Kit comercial GEN Elute™ – SIGMA. Para isso misturou-se 20 µL de proteinase K na concentração de 20mg/ml, 200 µL de sangue total (coletado em tubo com anticoagulante EDTA) e 200 µL de lise C, no vórtex, por 15 segundos e incubados em Banho Maria a 55°C, por 10 min. Em seguida, foram preparadas as colunas de purificação adicionando 500 µL de solução de preparo de coluna e realizando uma centrifugação a 1200 g por 1 min. Após os 10 min em banho maria, foram adicionados ao material previamente homogeneizado, 200 µL de etanol; esse material foi agitado em vórtex por 15 segundos e todo o material foi transferido para o microtubo com coluna e, centrifugado a 6500 g por 1 min. Após a centrifugação, a coluna foi transferida para um novo microtubo e foram adicionados a ela 500 µL de solução de pré lavagem, sendo realizada uma centrifugação a 6500 g por 1 min. Após a centrifugação, o líquido de pré lavagem foi descartado e acrescentaram-se 500 µL de solução de lavagem, centrifugando a 14000 g por 3 min. Repetiu-se este último passo. Por fim, a coluna foi transferida para novo microtubo, onde foram adicionados 50 µL de solução de eluição e, após 10 min em temperatura ambiente, centrifugou-se a 6500g por 1 min, sendo coletado o DNA já purificado. A quantificação do DNA foi feita em aparelho Nanovue Plus – Espectrofotômetro após calibração do equipamento com a mesma solução de eluição do DNA. Após quantificação as amostras foram ajustadas para uma concentração de trabalho de 100 ng/µL.

2.5 Reação em cadeia de polimerase (PCR)

O polimorfismo *COMT* G482A foi analisado por meio da reação em cadeia de polimerase (PCR) seguido pelo comprimento do fragmento de restrição polimorfismo (RFLP), baseado no protocolo anteriormente descrito.¹⁵ Foi feita uma reação de 50 µL contendo 2 µL de DNA (100 ng/µL), 5 µL de cada primer de *COMT* G482A (F, 5'-TCCACTTACTCATCCAGCTGG-3' e R, 5'-TCGAGGCCATCCACTCTTG-3') (0,5 µM, Sigma-Aldrich), 5 µL de Buffer (1x, Sigma-Aldrich), 5 µL de dNTPs (200 µM, Sigma-Aldrich), 0,5 de Taq polimerase (1U, Sigma-Aldrich) e 27,5 µL de água ultrapura estéril (q.s.p. 50 µL). A amplificação foi feita no Termociclador T100™ (Bio Rad) em 35 ciclos de: 94°C por 30'', 54°C por 40'' e 72°C por 50''. Ao final da PCR as amostras foram colocadas no gel de agarose a 1,5% (m/v em TBE 1X), em 80 mV por 40 min.

Os produtos de PCR foram então digeridos com a mistura de 4 µL de Buffer Red e 0,5 µL (1U) da enzima de restrição Anza™ 94 *BfmI*, a qual reconhece a sequência 5'...CQT Pu Py AG... 3', onde Pu pode ser a purina A ou G e, Py pode ser a pirimidina C ou T.

2.6 Análise estatística

Teste Exato de Fisher foi utilizado para verificar correlação entre polimorfismo e comportamento tumoral (benigna ou maligna), entre polimorfismo e imunomarcação para receptor de estrógeno, além de polimorfismo e metástase em linfonodo regional. Utilizou-se também Tabela de Regressão Logística, sendo o polimorfismo da *COMT* a variável dependente e as variáveis independentes: malignidade e imunoexpressão para receptor de estrógeno. Todas as análises foram realizadas com o programa estatístico Bioestat para Windows e considerou-se o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

3 RESULTADOS

A idade das cadelas do GE variou de cinco a 18 anos, com média de 10,2 anos, enquanto que as cadelas do GC tinham idade entre seis e 11 anos, média de 7,5 anos (Tabela 1). Animais sem raça definida (SRD) foram mais acometidos por neoplasia mamária (50,9% - 26/51), seguido pelas raças Daschund (9,8% - 5/51), Pinscher (9,8% - 5/51) e Poodle (9,8% - 5/51).

Tabela 1. Características clinicopatológicas de cadelas com neoplasia mamária e expressão de receptores de estrógeno.

Variáveis	Frequência Absoluta (N)	Frequência Relativa (%)
Idade		
< 9 anos	12	23,5
≥ 9 anos	39	76,4
Raça		
Akita	1	1,9
Cocker	2	3,9
Daschund	5	9,8
Labrador	1	1,9
Lhasa Apso	1	1,9
Maltês	1	1,9
Pastor Alemão	1	1,9
Pinscher	5	9,8
Pointer	1	1,9
Poodle	5	9,8
Sem Raça definida (SRD)	26	50,9
Shi Tzu	2	3,9
Metástase em linfonodo inguinal		
Presente	3	7,6
Ausente	36	92,3
Tipos Histopatológicos		
Adenoma Complexo	3	5,8
Adenoma Tubular	1	1,9
Carcinoma Adenoescamoso	2	3,9
Carcinoma Complexo	16	31,3
Carcinoma de Células Escamosas Mamário	1	1,9
Carcinoma em tumor misto	16	31,3
Carcinoma Simples (tubular,papilar,tubulopapilar)	8	15,6
Carcinoma Sólido	2	3,9
Carcinossarcoma	1	1,9
Comedocarcinoma	1	1,9
Receptor de estrógeno		
Positivo	10	19,6
Negativo	41	80,3
Ovariohisterectomia		
Não	21	41,1
Sim, previamente ao desenvolvimento do tumor	0	0
Sim, durante o procedimento de mastectomia	30	58,8

A maioria das neoplasias era maligna (47/51 – 92,1%). Os carcinomas mamários complexos e mistos foram os tipos histopatológicos mais frequentes, totalizando 62,7% (32/51) das neoplasias mamárias.

Nenhuma cadela era castrada no momento da retirada do tumor e a ovariohisterectomia foi realizada concomitante à mastectomia em 30 animais. A exérese de linfonodo inguinal para avaliação de metástase foi realizada em apenas 39 cadelas, das 51 estudadas. Três (7,7%) cadelas possuíam o linfonodo comprometido e 36 (92,3%) livres de células neoplásicas.

Das 51 cadelas, 18 (35,2%) apresentavam apenas um nódulo, enquanto que 33 (64,7%) apresentavam múltiplos nódulos, sendo as mamas abdominais caudais (M4) e inguinais (M5) as mais acometidas (38/51 - 77,5%).

No GE, 19,6% dos tumores tiveram marcação nuclear, na área de proliferação neoplásica, para receptor de estrógeno e no GC 87,5% (7/8) das mamas sem alterações, expressaram RE α (Figura 1).

Quanto ao tipo histológico e expressão de receptores de estrógeno, as neoplasias mamárias positivas foram: adenomas (20% - 2/10), carcinomas complexos (40% - 4/10), carcinomas mistos (30% - 3/10) e carcinoma tubulopapilar (20% - 2/10). Por outro lado, além dos tipos especiais, os carcinomas sólidos, comedocarcinoma e carcinossarcoma não expressaram RE α .

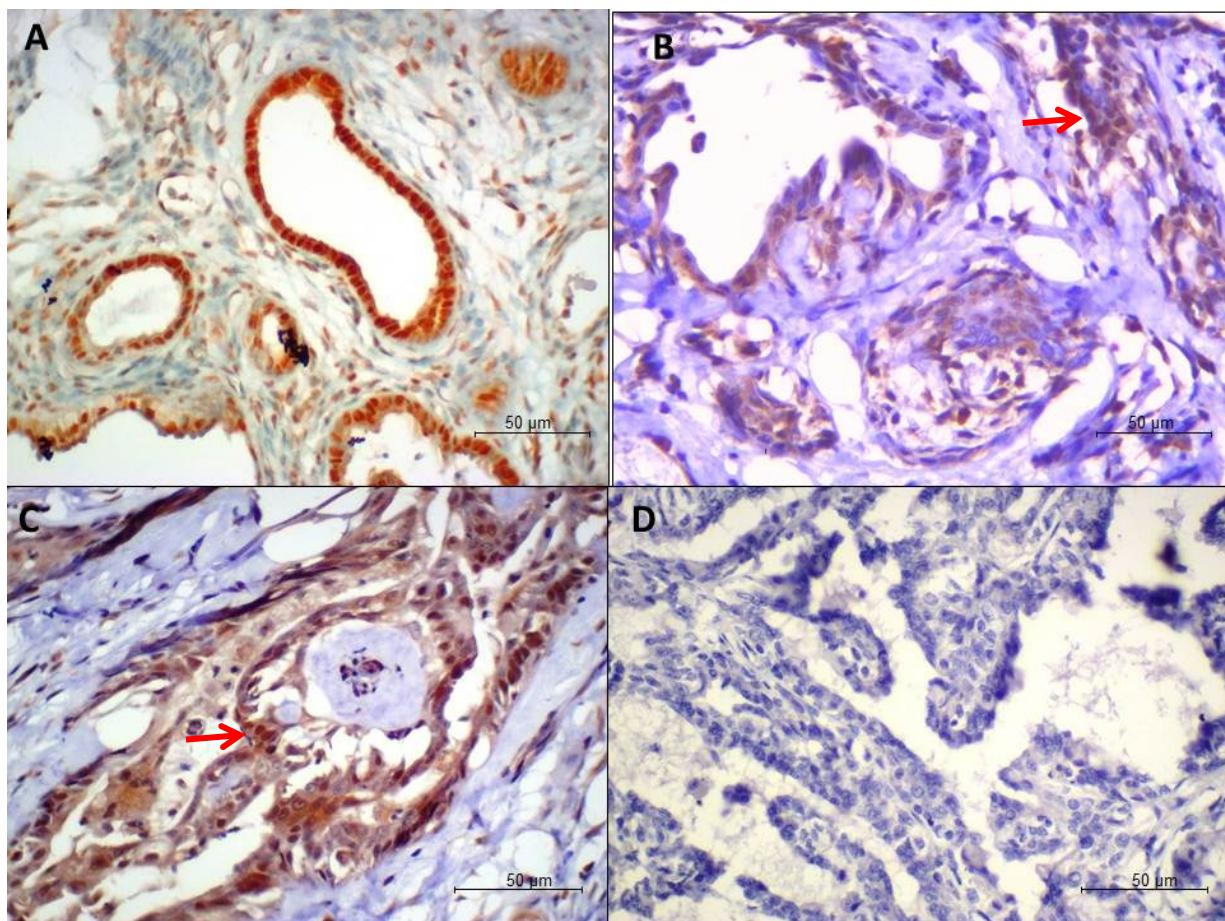


Figura 1. Fotomicrografias de marcação imuno-histoquímica (IHQ) de receptores de estrógeno (RE α). Método complexo streptavidina-biotina-peroxidase, cromógeno DAB, anticorpo primário anti-RE α , contracoloração com hematoxilina de Mayer, objetiva 40x. Bar $_ 50 \mu\text{m}$. (A) Útero de cadela – controle positivo. Marcação nuclear nas células epiteliais das glândulas uterinas. (B) Adenoma complexo positivo para expressão de RE α . Marcação nuclear nas células epiteliais mamárias neoplásicas (seta). (C) Carcinoma mamário em tumor misto positivo para expressão de RE α . Marcação nuclear nas células epiteliais mamárias neoplásicas (seta). (D) Carcinoma mamário em tumor misto negativo para expressão de RE α . Ausência de marcação nuclear nas células epiteliais mamárias neoplásicas.

A reação em cadeia de polimerase (PCR) para avaliar o polimorfismo *COMT G482A* foi realizada em 42 animais, 36 do GE e seis do GC. Dezessete cadelas (17/36 - 47,2%) do GE apresentaram polimorfismo (genótipo GA), enquanto que dezenove (19/36 - 52,7%) não apresentaram polimorfismo (genótipo GG). Apenas uma (1/6 - 16,6%) das seis cadelas do GC apresentou polimorfismo (Figura 2).

A tabela 2 demonstra os resultados em relação à associação do polimorfismo *COMT G482A* com algumas características tumorais, como malignidade, RE α e metástase em linfonodo inguinal.

Tabela 2. Correlação entre o polimorfismo da enzima *COMT* com comportamento tumoral, expressão de receptores de estrógeno e tipo histológico em carcinomas mamários, e metástase em linfonodo de cadelas portadoras de neoplasias mamárias.

	Polimorfismo		<i>P</i> *
	GG n (%)	GA n (%)	
Neoplasia benigna	3 (8,3)	0 (0)	
Neoplasia maligna	16 (44,4)	17 (47,2)	0,2682
< 9 anos	5 (13,8)	4 (11,1)	
≥ 9 anos	14 (38,8)	13 (36,1)	0,577
ER+	5 (13,8)	1 (2,7)	
ER-	14 (38,8)	16 (44,4)	0,2323
Carcinomas mistos	3 (14,2)	7 (33,3)	
Carcinomas complexos	5 (23,8)	6 (28,5)	0,7806
Linfonodo comprometido	1 (3,5)	1 (3,5)	
Linfonodo livre	13 (46,4)	13 (46,4)	0,4631

*Teste Exato de Fisher

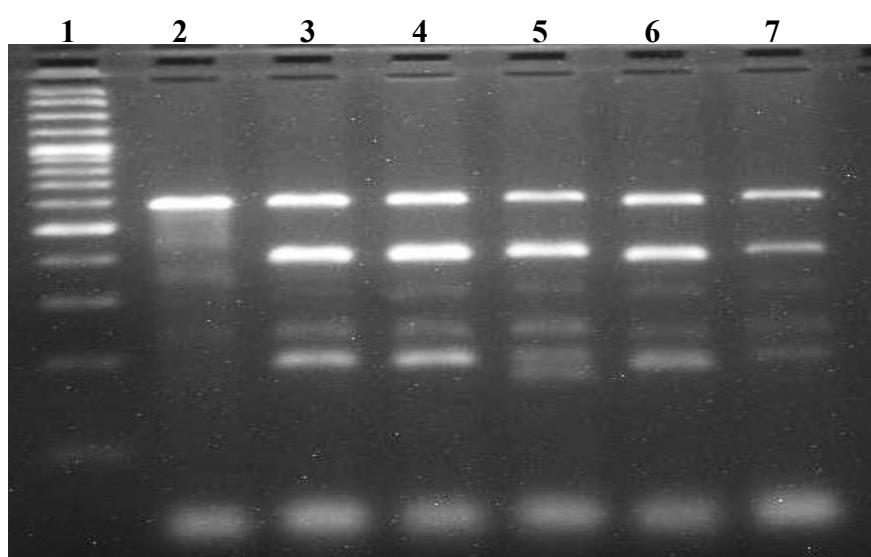


Figura 2. Análise RFLP baseada em PCR no gene *COMT* de cadelas com neoplasia mamária (GE). Linha 1 com marcador de peso molecular, linha 2 produto de PCR sem digestão. Linhas 3, 4, 6 e 7 contem DNA de cadelas sem polimorfismo (GG) e linha 5 de cedula com polimorfismo (GA).

Todas as cadelas com neoplasias benignas não apresentavam o alelo A, porém estatisticamente não houve diferença significativa quando comparado neoplasias benignas e malignas com polimorfismo *COMT G482A* ($p=0.135$).

Com relação ao receptor de estrógeno, 80% (4/5) das cadelas com carcinomas com imunomarcação positiva para RE α não apresentavam polimorfismo no gene *COMT*. Já as cadelas com carcinomas sem imunomarcação para RE α , 57,1% (16/28) apresentavam polimorfismo no gene *COMT* e 42,8% (12/28) não apresentavam. Em análise estatística univariada, não houve correlação entre polimorfismo e RE α ($p=0.148$).

Não houve diferença entre os tipos histológicos (carcinomas simples e complexos) e polimorfismo no gene *COMT* ($p=0.182$), assim como entre o polimorfismo e a capacidade da neoplasia realizar metástase em linfonodo inguinal ($p=0.759$) e polimorfismo e idade ($p=0.577$).

Utilizando o polimorfismo no gene *COMT G482A* como variável dependente avaliou-se, por meio da análise de regressão múltipla, a correlação com a malignidade (benigno X maligno) e a imunomarcação para receptor de estrógeno. Houve correlação entre neoplasias malignas, marcação para estrógeno negativa e polimorfismo no gene ($p=0.037$), conforme equação $p = 1/1+e^{(-12,46+11,08X_1 +1,67X_2)}$, sendo X_1 malignidade e X_2 RE α .

4 DISCUSSÃO

As cadelas sem raça definida (50.9%) e acima de nove anos foram as mais acometidas pelas neoplasias mamárias, achados esses que se assemelham aos descritos por outros autores.^{15, 7, 8, 16, 17}

As mamas abdominal caudal (M4) e/ou inguinal (M5) foram as mais acometidas (77.55%), semelhante ao relatado por outros estudos (72.5%)¹⁸ e (66.6%).¹⁹

Como a maioria dos nódulos tumorais ocorreram nas mamas abdominais caudais e inguinais, somente o linfonodo inguinal foi avaliado e apenas 7.69% das cadelas apresentaram metástase em linfonodo. Estudo anterior avaliando invasão em vasos linfáticos peritumorais e/ou em linfonodo regional identificou invasão em 31% dos tumores malignos e demonstrou que há correlação entre invasão de células neoplásicas com sobrevida, risco de morte, recorrência local, além de metástase à distância.¹²

A imuno-histoquímica para pancitoqueratina tem alta sensibilidade para detectar micrometástases e células tumorais ocultas em linfonodos negativos por exame

histopatológico.¹⁸ Neste caso, a baixa detecção de mestástase pode ter sido influenciada pela menor sensibilidade do teste histopatológico.

Quanto ao tipo histológico, os carcinomas mamários mistos e complexos foram os mais diagnosticados, seguido pelos carcinomas simples. O carcinoma complexo é considerado um dos tipos histológicos mais frequentes, seguido pelo carcinoma simples, subtipo tubulopapilar.^{15,7, 20, 17, 16, 12, 21}

É importante conhecer e avaliar a síntese e catabolismo do estrógeno, bem como a sensibilidade do tecido a este hormônio, diante da estreita relação entre o risco de câncer de mama e a exposição a esse hormônio.²²

A influência do estrógeno sobre a carcinogênese mamária em cadelas pode ser evidenciada pelo efeito protetor da castração precoce. Animal que é castrado após o segundo cio tem o mesmo risco de desenvolvimento de tumores malignos que cadelas não castradas.²³ Todas as cadelas do presente estudo não eram castradas, ou seja, receberam influência hormonal até o momento da mastectomia.

Recentemente verificou-se que nem todos os cães com neoplasia mamária maligna se beneficiam da castração no momento da mastectomia. A OSH no momento da mastectomia foi válida em animais com neoplasias graduadas em II, receptor de estrógeno positivo e/ou com aumento sérico de estrógeno.^{24,25}

Glândulas mamárias normais de cadelas expressam receptores de estrógeno, porém esta expressão decresce progressivamente em hiperplasias e tumores malignos.²

Esta variação na expressão de receptores de estrógeno também foi observada neste estudo, pois a maioria das neoplasias que não expressaram este receptor eram malignas, assim como todas as amostras de carcinomas de tipos especiais, carcinomas sólidos, comedocarcinoma e carcinossarcoma. Além disto, no GC 87,5% (7/8) das mamas expressaram REa.

Diversos estudos com neoplasias mamárias caninas avaliaram a imunomarcação para estrógeno por meio da IHQ e verificaram maior expressão de estrógeno nos tumores benignos quando comparado aos tumores malignos.^{7,8}

Os tumores benignos (adenomas simples e complexos), assim como os carcinomas tubulares simples tiveram uma maior expressão de receptor de estrógeno, enquanto que os outros subtipos de carcinoma (sólido, anaplásico e comedocarcinoma) e mioepiteliomas malignos tiveram expressão fraca.²⁶ Estes autores também relataram que a expressão do receptor foi maior em tumores benignos em relação aos malignos e significativamente menor nas cadelas castradas quando comparada às não castradas.²⁶

No GE, 19,6% dos tumores expressaram receptor de estrógeno. Em estudo retrospectivo²⁷, os percentuais de marcação positiva para RE α variaram de 10% a 92,3%. Baixa expressão de RE α em TMC já foram relatadas em estudos prévios, com percentuais variando de 6,3%²⁹ a 31%.²⁹

Todas as cadelas com neoplasias benignas do GE não apresentavam o alelo A. Entretanto, não houve diferença na presença do polimorfismo *COMT G482A* entre cadelas com neoplasias benignas e malignas. O pequeno número de cadelas portadoras de neoplasias benignas pode ter gerado viés no estudo e prejudicado a avaliação estatística desta correlação.

Outros estudos com cadelas^{4,6} também não observaram diferenças significativas entre a classificação histológica e o polimorfismo da enzima. Porém, estudo humano evidenciou relação entre a baixa atividade da enzima *COMT* com desenvolvimento de neoplasias mamárias em mulheres.³⁰

Na mulher, o polimorfismo do *COMT* também foi relacionado com estágio clínico e à extensão da metástase em linfonodo regional no câncer de mama, sendo que 67% das mulheres com o alelo *COMT* de baixa atividade tinham metástase em linfonodo regional.⁵ Porém neste estudo não foi possível estabelecer correlação entre metástase em linfonodo e polimorfismo do *COMT*. Da mesma maneira, outras pesquisas avaliaram e não observaram relação entre polimorfismo do *COMT* e metástases em cadelas.^{4,6}

Não foi observada correlação entre polimorfismo do *COMT* e idade da cadelas no momento da mastectomia. Em estudo anterior, foi relatado efeito protetor do polimorfismo na idade de início dos tumores mamários, onde cadelas portadoras do alelo variante tiveram uma probabilidade três vezes maior de desenvolver neoplasias mamárias após os nove anos de idade, em comparação com as cadelas não portadoras.⁴

O status do receptor de estrógeno de cada animal pode ser um fator determinante na influência do genótipo *COMT* no resultado de neoplasias mamárias e sua avaliação poderia ser uma estratégia útil para avaliar valor prognóstico do genótipo *COMT* em cadelas que expressam ou não receptor de estrógeno.⁶

Esperava-se que cadelas portadoras de polimorfismo exibissem menor expressão de RE α , porém não houve correlação entre a expressão de RE α e o polimorfismo da enzima ($p=0.148$) em análise univariada.

Porém na análise de regressão múltipla, a probabilidade da cedula que tem polimorfismo desenvolver carcinoma mamário, receptor de estrógeno negativo é de 57,14% e de 20% quando são carcinomas receptores de estrógeno positivo.

O efeito protetor da enzima *Catecol-O-Metiltransferase* ocorre durante o início da carcinogênese. As reações de hidroxilação são as principais formas de catabolização do estrógeno, resultando em componentes carcinogênicos, como 4-hidroxiestrona e 16 α-hidroxiestradiol. Os metabólitos 2-hidroxi e 4-hidroxi são transformados em metabólitos metoxilados anticarcinogênicos pela enzima *catechol-O-metiltransferase*, sendo esta considerada importante na inativação de metabólitos de estrogênio cancerígenos, reduzindo o potencial de dano mutagênico.^{31,4,32}

A relação da variação do genótipo da COMT com o maior risco de desenvolvimento de neoplasia mamária associado ao estrógeno pode ser explicada pela variação no genótipo resultar em menor atividade enzimática e consequentemente menor inativação dos catecósis biologicamente ativos e tóxicos, além disso, outra possibilidade é que existam níveis menores desta nos tecidos e células, quando há algum tipo de polimorfismo. Ambas acarretam em menor desintoxicação de catecósis tóxicos, os quais acumulam no tecido e levam a danos celulares.³³

Assim, nas cadelas portadoras do polimorfismo haveria menor efeito protetor da *COMT* resultando em desenvolvimento de carcinomas mamários indiferenciados, com menor expressão de receptores de estrógeno.

O desenvolvimento do tumor mamário é evento já programado nos primeiros anos de vida da cadela e não é influenciado pela supressão do estímulo hormonal na maturidade.³⁴ O estrógeno pode atuar por ligação a RE presente em células epiteliais e estromais da glândula mamária induzindo nestas células uma expressão aumentada de receptores de progesterona. Dentro dessa hipótese, o estrógeno atuaria no estágio inicial da doença e uma perda progressiva de RE ocorreria durante a evolução da doença, resultando em não-reatividade de RE em carcinomas mamários.³⁵

Conclui-se que cadelas portadoras de polimorfismo da enzima *COMT* desenvolvem com maior frequência carcinomas mamários receptor de estrógeno negativo. Estudos *in vitro* com linhagens celulares de neoplasia mamária de cadelas são necessários para se verificar até que ponto a falta do efeito protetor desta enzima no início da carcinogênese pode influenciar o desenvolvimento de carcinomas mamários. A ausência de correlação do polimorfismo com as variáveis clinicopatológicas em análise univariada pode ter sido influenciada pelo pequeno número de animais portadores de neoplasias benignas e por isso estudos mais extensos são necessários.

Agradecimentos

A todos os médicos veterinários residentes e professores da UFU e UNIFRAN que auxiliaram na avaliação das cadelas portadoras de neoplasias mamárias. Ao Me. Igor Paula de Castro e Sr. José Luiz de Souza pelo auxílio laboratorial. A Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo auxílio financeiro através do projeto PPM-00758-16 (Chamada 02/2016 – Programa Pesquisador Mineiro).

Conflito de interesses

Os autores não têm conflito de interesse a declarar.

ORCID

Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi <https://orcid.org/0000-0003-0629-4145>

Larissa Fernandes Magalhães <https://orcid.org/0000-0002-0986-2083>

REFERÊNCIAS

1. Moe L. Population-based incidence of mammary tumours in some dogs breeds. *J Reprod Suppl.* 2001; 57:439–443.
2. Goldschmidt MH, Peña L, Zappulli V. Tumors of the Mammary Gland. In: Meuten DJ, ed. Tumors in Domestic Animals. 5th ed. Ames, IA: Iowa State Press, 2017:723-766.
3. Bergman-Jungeström M, Wingren S. Catechol-O-Methyltransferase (*COMT*) gene polymorphism and breast cancer risk in young women. *Br J Cancer.* 2001; 85 (6):859–862. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2001.2009>
4. Pereira PD, Lopes CC, Matos AJF, et al. Estrogens Metabolism Associated with polymorphisms: Influence of *COMT* G482a Genotype on Age at Onset of Canine Mammary Tumors. *Vet Pathol.* 2008; 45:124–130. <https://doi.org/10.1354/vp.45-2-124>
5. Matsui A, Ikeda T, Enomoto K, et al. Progression of human breast cancers to the metastatic state is linked to genotypes of catechol-O-methyltransferase. *Cancer Lett.* 2000; 150:23-31. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(99\)00368-7](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(99)00368-7)
6. Pereira PD, Lopes CC, Matos AJF, et al. Influence of Catechol-O-Methyltransferase (*COMT*) Genotypes on the Prognosis of Canine Mammary

- Tumors. *Vet Pathol.* 2009; 46: 270–1274. <https://doi.org/10.1354/vp.08-VP-0298-D-FL>
7. Yang W-Y, Liu C-H, Chang C-J, Lee C-C, Chang K-J, Lin C-T. Proliferative Activity, Apoptosis and Expression of Oestrogen Receptor and Bcl-2 Oncoprotein in Canine Mammary Gland Tumours. *J. Comp. Path.* 2006; 134(1):70–79. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2005.07.002>
 8. Mohr A, Ripoli FL, Hammer SC, et al. Hormone Receptor Expression Analyses in Neoplastic and Non-Neoplastic Canine Mammary Tissue by a Bead Based Multiplex Branched DNA Assay: A Gene Expression Study in Fresh Frozen and Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Samples. *PLoS One.* 2016; 11(9):1-15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163311>
 9. Mainenti M, Rasotto R, Carnier P, Zappulli V. Oestrogen and progesterone receptor expression in subtypes of canine mammary tumours in intact and ovariectomised dogs. *Vet J.* 2014; 202:62–68. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.06.003>
 10. Goldschmidt M, Peña L, Rasotto R, Zappulli V. Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet Pathol.* 2011; 48:117–131. <https://doi.org/10.1177/0300985810393258>
 11. Elston CW, Ellis IO. 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. *Histopathol.* 1991; 19:403-410.
 12. Rasotto R, Berlato D, Goldschmidt MH, Zappulli V. Prognostic Significance of Canine Mammary Tumor Histologic Subtypes: An Observational Cohort Study of 229 Cases. *Vet Pathol.* 2017; 54(4):571-578. <https://doi.org/10.1177/0300985817698208>
 13. Gama A, Alves A, Schmitt F. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Arch.* 2008; 453:123–132. <https://doi.org/10.1007/s00428-008-0644-3>
 14. Masuda K, Hashizume C, Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y. Breed differences in genotype and allele frequency of catechol O-methyltransferase gene polymorphic regions in dogs. *J Vet Med Sci.* 2004; 66(2):183-187. <https://doi.org/10.1292/jvms.66.183>

15. Sassi F, Benazzi C, Castellani G, Sarli G. Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. *BMC Vet Res.* 2010; 6(5). <https://doi.org/10.1186/1746-6148-6-5>
16. Spoerri M, Guscetti F, Hartnack, S, et al. Endocrine control of canine mammary neoplasms: serum reproductive hormone levels and tissue expression of steroid hormone, prolactin and growth hormone receptors. *BMC Vet Res.* 2015; 11(235). <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0546-y>
17. Chang C-C, Tsai M-H, Liao J-W, Chan JP-W, Wong M-L, Chang S-C. Evaluation of hormone receptor expression for use in predicting survival of female dogs with malignant mammary gland tumors. *J Am Vet Med Assoc.* 2009; 235(4):391-396. <https://doi.org/10.2460/javma.235.4.391>
18. Coletto AF, Wilson TM, Soares NP, et al. Prognostic Value of Occult Isolated Tumour Cells within Regional Lymph Nodes of Dogs with Malignant Mammary Tumours. *J Comp Pathol.* 2018; 158:32-38. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2017.11.001>
19. De Araújo MR, Campos LC, Ferreira, E, Cassali GD. Quantitation of the regional lymph node metastatic burden and prognosis in malignant mammary tumors of dogs. *J Vet Intern Med.* 2015; 29:1360-1367. <https://doi.org/10.1111/jvim.13576>
20. Nguyen F, Peña L, Ibisch C, et al. Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 1: natural history and prognostic factors. *Breast Cancer Res Treat.* 2017; 167(3):635-648. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4548-2>
21. Kim N-H, Lim H-Y, Im K-S, Shin J-I, Kim H-W, Sur J-H. Evaluation of Clinicopathological Characteristics and Oestrogen Receptor Gene Expression in Oestrogen Receptor-negative, Progesterone Receptor-positive Canine Mammary Carcinomas. *J Comp Pathol.* 2014; 151:42-50. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2014.04.001>
22. Clemons M, Goss P. Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med.* 2001; 344(4).
23. Schneider R, Dorn CR, Taylor DON. Factores influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *J Natl Cancer Inst.* 1969; 43:1249–1261. <https://doi.org/10.1093/jnci/43.6.1249>
24. Kristiansen VM, Peña L, Díez Córdova L, et al. Effect of Ovariohysterectomy at the Time of Tumor Removal in Dogs with Mammary Carcinomas: A

- Randomized Controlled Trial. *J Vet Intern Med.* 2016; 30:230–241.
<https://doi.org/10.1111/jvim.13812>
- 25.** Queiroga FL, Pérez-Alenza MD, Silvan G, Peña L, Lopes C, Illera JC. Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. *J Steroid Bioch Mol Biol.* 2005; 94:181–187. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.12.014>
- 26.** Wan G-X, Cao Y-W, Li W-Q, Li Y-C, Li F. The Catechol-O-Methyltransferase Val158Met Polymorphism Contributes to the Risk of Breast Cancer in the Chinese Population: An Updated Meta- Analysis. *J Breast Cancer.* 2014; 17(2):149-156. <https://doi.org/10.4048/jbc.2014.17.2.149>
- 27.** Peña L, Gama A, Goldschmidt MH, et al. Canine Mammary Tumors: A Review and Consensus of Standard Guidelines on Epithelial and Myoepithelial Phenotype Markers, HER2, and Hormone Receptor Assessment Using Immunohistochemistry. *Vet Pathol.* 2014; 51(1): 127-145.
<https://doi.org/10.1177/0300985813509388>
- 28.** De Las Mulas Jm, Millan Y, Dios R A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor alpha and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. *Vet Pathol.* 2005; 42: 200-212.
<https://doi.org/10.1354/vp.42-2-200>
- 29.** Illera JC, Pérez-Alenza MD, Nieto A, et al. Steroids and receptors in canine mammary cancer. *Steroids.* 2006; 71: 541–548.
<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2005.11.007>
- 30.** Lavigne JA, Helzlsouer KJ, Huang H-Y, et al. An Association between the Allele Coding for a Low Activity Variant of Catechol-0-methyltransferase and the Risk for Breast Cancer. *Cancer Res.* 1997; 57:5493-5497.
- 31.** Lemons MC, Goss P. Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med.* 2001; 344(4). <https://doi.org/10.1056/NEJM200101253440407>
- 32.** Yager JD, Liehr JG. Molecular Mechanisms Of Estrogen Carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1996; 36:203-32.
<https://doi.org/10.1146/annurev.pa.36.040196.001223>
- 33.** Yan L, Xiaofeng Y, Richard BB, Judy LB. Characterization of two new variants of human catechol O-methyltransferase in vitro. *Cancer Letters.* 2005; 231(1):81–89. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.12.022>

34. Fonseca CS, Daleck CR. Neoplasias mamárias em cadelas: influência hormonal e efeito da ovário-histerectomia como terapia adjuvante. *Ciênc Rural*. 2000; 30 (4):731-735.
35. Millanta F, Calandrella M, Bari G, Niccolini M, Vannozzi I, Poli A. Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Res Vet Sci*. 2005; 79:225–232.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.02.002>