

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

NICOLLE PEREIRA SOARES

**IMUNOFENÓTIPO MOLECULAR DE CARCINOMAS MAMÁRIOS CANINOS E
SUA RELAÇÃO COM FATORES DE PROGNÓSTICO E SOBREVIDA**

DOUTORADO

UBERLÂNDIA

2019

NICOLLE PEREIRA SOARES

**IMUNOFENÓTIPO MOLECULAR DE CARCINOMAS MAMÁRIOS CANINOS E
SUA RELAÇÃO COM FATORES DE PROGNÓSTICO E SOBREVIDA**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência parcial para obtenção de título de doutora em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Saúde Animal

Orientador (a): Prof^ª. Dra. Alessandra Aparecida Medeiros- Ronchi

UBERLÂNDIA

2019

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

S676i
2019 Soares, Nicolle Pereira, 1985
Imunofenótipo molecular de carcinomas mamários caninos e sua
relação com fatores de prognóstico e sobrevida [recurso eletrônico] /
Nicolle Pereira Soares. - 2019.

Orientadora: Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.1253>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Veterinária. 2. Castração. 3. Neoplasias da mama. 4. Cão -
Doenças. 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



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ATA DE DEFESA

Programa de Pós-Graduação em:	Ciências Veterinárias				
Defesa de:	TESE DE DOUTORADO Nº PPGCV/006/2019				
Data:	09 de Maio de 2019	Hora de início:	8:20	Hora de encerramento:	12:30
Matrícula do Discente:	11513MEV009				
Nome do Discente:	NICOLLE PEREIRA SOARES				
Título do Trabalho:	IMUNOFENÓTIPO MOLECULAR DE CARCINOMAS MAMÁRIOS CANINOS E SUA RELAÇÃO COM FATORES DE PROGNÓSTICO E SOBREVIDA				
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				

Reuniu-se na sala de Reunião da PROPP, bloco 3 P, Campus Santa Mônica, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Professores Doutores: Carolina Franchi João - Universidade Federal de Uberlândia; Matias Pablo Juan Szabó - Universidade Federal de Uberlândia; Geórgia Modé Magalhães - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais; Helenice Gobbi - Universidade Federal do Triângulo Mineiro; Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi orientador(a) do(a) candidato(a). Ressalta-se que o Profa. Dra. Geórgia Modé Magalhães participou da defesa por meio de vídeo conferência (ou skype ou outro meio eletrônico) desde a cidade de Muzambinho – Minas Gerais e os demais membros da banca e o aluno participaram *in loco*.

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Alessandra Aparecida Medeiros Ronchi, Professor(a) do Magistério Superior**, em 09/05/2019, às 12:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carolina Franchi João, Professor(a) do Magistério Superior**, em 09/05/2019, às 12:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Matias Pablo Juan Szabo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 09/05/2019, às 12:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Georgia Modé Magalhães, Usuário Externo**, em 13/05/2019, às 19:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **HELENICE GOBBI, Usuário Externo**, em 17/05/2019, às 11:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1230181** e o código CRC **02B681F9**.

AGRADECIMENTOS

“Agradecer é admitir que um momento se precisou de alguém. Ninguém e nada cresce sozinho, sempre é preciso um olhar de apoio, uma palavra de incentivo, um gesto de compreensão.”

João Lucas de Lima Paixão

Tenho medo de me esquecer, neste momento, de pessoas importantes que fizeram parte deste longo e árduo processo de minha vida. O grande sonho que me fez deixar de dormir longas noites, mas não me impediu de sonhar!

Agradeço inicialmente a oportunidade da vida, concedida por alguma energia maior que eu acredito ser Deus. Esta vida não seria possível se não fosse pelo amor de meu pai e minha mãe que se sacrificaram por mim. Agradeço a minha irmã, ao amor incondicional que sentimos uma pela outra. À minha querida vizinha Juventina (*in memoriam*), gratidão por sua vida, sua força, esforço e vontade de lutar e viver sempre.

Ao meu marido, por me ouvir, me amar, me ajudar, me respeitar e ser meu companheiro de horas felizes e difíceis. Você é um homem maravilhoso na minha vida!

A minha querida amiga Ellen, por todos estes anos de amizade, minha verdadeira amiga! Amo você! A todos meus amigos, em especial: Suzi, minha querida personal, Jeovane Felipe, Angélica (Fofinha), Fernando Mundim, Raquel Paiva, sei que vocês torcem por minha vitória! Obrigada!

A todos meus amigos da UFU, em especial: Igor Castro, obrigada por me ajudar com as imunohistoquímicas, obrigada pelos conselhos, por me ouvir e pelos florais. À querida amiga Taís Meziara! Você me ensinou minhas primeiras imunohistoquímica e jamais me esquecerei de você! Aos queridos amigos de sempre, Suzana Akemi e Matheus Matioli, obrigada!

Agradeço imensamente a Thaís Almeida, amiga e colaboradora fiel de todos meus trabalhos! Você foi essencial para a realização e finalização deste processo. Toda a felicidade que sinto por sua colaboração, quero que sempre receba em dobro! Obrigada sempre!

A minha orientadora querida, Prof.a Alessandra. Sou o que sou, profissionalmente, porque tenho você comigo! São 10 anos de trabalho, pesquisas, cumplicidade e muitas conversas! Obrigada por confiar e acreditar sempre em mim. Te amo!

Aos meus queridos professores, como vocês são importantes para mim! Me alegro por ter um pouco de vocês na minha formação e no meu aprendizado. Em especial: Prof. Matias Szabó, Rodrigo Pereira, Márcio Botelho, Prof.a Geórgia Modé, Márcio Bandarra, Fernando Ferreira, José Eugênio de Bastos, Fernando Cristino e Marcelo Silva.

A todos meus amigos, professores, queridos alunos e orientados do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM). Lugar em que aprendi a trabalhar, cresci, aprendi que nem sempre o conhecimento científico basta na vida. “É preciso saber viver”! São tantas pessoas que aqui se incluem... minha gratidão a cada um de vocês, em especial: Rizza (Amorzinho), André, Maria Clara, Aline Estefane, Luiz Fernando Botelho, Lucas de Assis, Márcio Arvelos, Rodrigo Hiroshi e Marcos Antônio de Almeida.

A UFU, ao Hospital Veterinário, a todos os funcionários e laboratórios que me acolheram com carinho, para que a realização deste projeto fosse possível. Meu carinho e gratidão a todos vocês, em especial: Laboratório de Patologia Animal – UFU e os residentes!

A CAPES e a FAPEMIG pelo auxílio financeiro. Obrigada por confiarem no meu trabalho e de toda a equipe do Laboratório de Patologia Animal – UFU. **Muito obrigada!**

RESUMO

As neoplasias estão entre as afecções mais comuns em cães, sendo que tumores mamários espontâneos são os mais frequentes em cadelas fêmeas. Mais de 50% dos casos são malignos e representam um grupo de grande heterogeneidade em termos de morfologia e comportamento biológico. A expressão molecular de receptores de estrógeno (RE) e receptores de progesterona (RP) são considerados fatores de prognóstico, sendo a expressão de RE essencial para determinação da caracterização molecular. Outro marcador molecular frequentemente avaliado em oncologia humana é o fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER2), na cadela, é frequentemente expresso em tumores mamários malignos e correlaciona-se com pleomorfismo nuclear, alto grau histológico e índice mitótico, além de menor sobrevida. A ausência de expressão de RE, RP e HER2 caracteriza o fenótipo triplo negativo. Na mulher este fenótipo está relacionado a histologia tumoral agressiva, prognóstico ruim, presença de metástases e recidivas. Na cadela também apresentam comportamento agressivo, prognóstico desfavorável e redução de sobrevida. Objetivou-se neste trabalho verificar a expressão de RE e a frequência do fenótipo triplo negativo em carcinomas mamários caninos (CMC) e correlacioná-las com características clinicopatológicas, sobrevida global (SG), intervalo livre de doença e tempo de desenvolvimento de tumor em mama remanescente em cadelas. Foram incluídas neste estudo 84 cadelas. Elas foram submetidas a exame radiográfico e de ultrassonografia, para avaliação de metástases pulmonares e a distância, e que realizaram exérese cirúrgica como tratamento para o tumor de mama (mastectomia unilateral total ou bilateral total). As amostras de neoplasias mamárias foram avaliadas quanto ao tipo e grau histológico, invasividade estromal, e a expressão de RE, RP e HER2 por meio de imunohistoquímica. Neste estudo, a expressão de estrógeno foi identificada em 30,95% de carcinomas mamários caninos, de cadelas idosas, tipo histológico complexo grau II. A idade foi identificada como fator de prognóstico nos tumores mamários de cadelas e neoplasias de menor grau histológico expressam mais RE. A avaliação isolada deste marcador molecular não foi um bom fator de prognóstico quando se considera sobrevida global ($483,42 \pm 319,17$ dias) tempo livre de doença ($234,45 \pm 241,05$ dias) e o tempo de desenvolvimento de tumor em mama remanescente ($279,68 \pm 317,75$ dias). Ainda, 21,43% dos CMC foram identificados como fenótipo triplo negativo. Nenhum dos parâmetros clinicopatológicos avaliados (tipo e grau histológico, estadios clínicos, invasividade estromal, idade, tamanho e localização tumoral) diferiram significativamente entre os dois grupos de CMC (triplo negativos e não triplo negativos), exceto a castração. Além disso, observou-se correlação desta variável, na análise multivariada, com a SG ($471,42 \pm 353,45$ dias). O comportamento dos CMC triplo negativo parece ser menos agressivo quando comparado com o da mulher. A utilização de outros marcadores moleculares, como Ki-67, P53, P-caderima, podem auxiliar na diferenciação de subgrupos moleculares dentro do fenótipo triplo negativo e levar à identificação de fenótipos triplo negativos mais ou menos agressivos. Assim como ocorre com CMC em geral, a castração pode influenciar na ocorrência de CMC triplo negativo.

Palavras- chave: castração, HER2, receptor de estrógeno, receptor de progesterona, tumores mamários caninos.

ABSTRACT

Neoplasias are the most common affections in dogs, and the spontaneous mammary tumors are the most frequent in female bitches. More than 50% of the cases are malignant and it represents a heterogeneity disease group with variable morphology and biological behavior. Molecular expression of estrogen receptors (ER) and progesterone receptors (PR) are considered prognostic factors, and ER expression is essential for determination of molecular classification. Another molecular marker frequently evaluated in human breast cancer is type 2 human epidermal growth factor (HER2). 84 bitches were included in this study. The radiographic and ultrasound examination were performed in order to verify metastases in lung and nodal metastases. The surgical excision was a treatment for the mammary tumor (total or bilateral unilateral mastectomy). Samples of mammary neoplasms were evaluated for histological type and the expression of ER, PR and HER2 by immunohistochemistry. Evaluation of total overall survival (OS), disease-free interval (DFS) and time to tumor development in remaining breast (TDTMR) was performed. ST was defined as time after mastectomy up to the date of death; the DFS was the time after mastectomy until the development of recurrence or metastasis, and the TDTMR was determined as the time after mastectomy until the appearance of tumor in the remaining mammary gland. In the bitch, it is often expressed in malignant mammary carcinoma and correlates with nuclear pleomorphism, high histological grade and mitotic index, as well as lower survival. Absence of ER, PR and HER2 expression characterizes the triple negative phenotype. In women, this phenotype is related to aggressive tumor histology, poor prognosis, presence of metastases and recurrences. In bitch, they also present aggressive behavior, poor prognosis and reduction of survival. The objective of this study was to verify the expression of ER and the frequency of triple negative phenotype in canine mammary carcinomas (CMC) and correlate them with clinicopathological characteristics, overall survival (OS), disease-free interval and tumor development time in the breast remaining in bitches. In this study, the expression of estrogen was identified in 30.95% of canine mammary carcinomas, old-aged bitches, complex histological type grade II. Age was identified as a prognostic factor in canine mammary tumors and neoplasms of lower histological grade expressed more ER. The isolated evaluation of this molecular marker was not a good prognostic factor when considering total survival (483.42 ± 319.17 days) disease-free time (234.45 ± 241.05 days) and the time of tumor development in remaining mammary gland (279.68 ± 317.75 days). Furthermore, 21.43% of CMC were identified as a triple negative phenotype. None of the clinicopathological parameters evaluated (type and histological grade, clinical stages, stromal invasiveness, age, size and tumor location) differed significantly between the two CMC groups (triple negative and non triple negative), except for castration. In addition, we observed a correlation of this variable in the multivariate analysis with ST (471.42 ± 353.45 days). The behavior of the triple negative CMC seems to be less aggressive than in woman. The use of other molecular markers (Ki67, P53, P-caderina) must be used to distinguish the molecular subgroups in triple negative phenotype, and lead to the identification of more or less aggressive triple negative phenotypes. As similar CMC in general, castration may influence the occurrence of CMC triple negative.

Keywords: castration, estrogen receptors, HER2, mammary gland tumors, progesterone receptors

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais	8
1. Introdução.....	9
2. Revisão de Literatura	10
2.1- Anatomia, histologia e desenvolvimento da glândula mamária	10
2.2- Epidemiologia, classificação e graduação histológica de tumores mamários em cadelas.....	12
2.3- Influência hormonal na carcinogênese mamária.....	15
2.4- Expressão de HER2 e fatores de prognóstico.....	19
2.5- Fenótipo triplo negativo e fatores de prognóstico na mulher e na cadela	24
3. Considerações finais.....	29
CAPÍTULO 2 - Sobrevida de cadelas com carcinoma mamário: influência de variáveis clínicopatológicas e expressão de receptores de estrógeno (ERα).....	46
CAPÍTULO 3 - Fenótipo triplo negativo em carcinomas mamários de cadelas e correlação com fatores de prognóstico e sobrevida	67

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. Introdução

As neoplasias estão entre as afecções mais comuns em cães, sendo que tumores mamários espontâneos são os mais frequentes em cadelas fêmeas adultas não castradas (GOLDSCHMIDT; PEÑA; ZAPPULLI, 2017). Mais de 50% dos casos são malignos (SORENMO et al., 2013) e representam um grupo de grande heterogeneidade em termos de morfologia e comportamento biológico (CASSALI, 2017; SLEECKX et al., 2011).

No câncer de mama humano, marcadores imunohistoquímicos (IHC), junto com variáveis clinicopatológicas são utilizados para determinação do prognóstico e seleção do tratamento (WALKER, 2008). Em Medicina Veterinária, estudos também tem demonstrado que marcadores IHC tem correlação com o comportamento, grau e evolução dos tumores mamários e nos últimos anos têm sido utilizados em vários centros de pesquisa e de diagnóstico veterinário (FERREIRA et al., 2017).

Na mulher e na cadela, o componente hormonal é considerado uma importante etiologia para o câncer de mama. A expressão de receptores de estrógeno (RE) e receptores de progesterona (RP) em tumores de mama é considerada fator de prognóstico e prediz uma resposta terapêutica hormonal no câncer de mama humano (NADJI et al., 2005; PEÑA et al., 2014). Em neoplasias mamárias de cadelas a expressão estes hormônios também são considerados fatores de prognóstico (DE LAS MULAS; MILLÁN; DIOS, 2005; PEÑA et al., 2014), sendo a expressão de RE essencial para determinação da caracterização molecular (GAMA; ALVES; SCHMITT, 2008; IM et al., 2014).

Outro marcador molecular frequentemente avaliado em oncologia humana é o fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER2). Sua expressão está relacionada com aumento da agressividade tumoral, de recidivas e da mortalidade (WOLFF et al., 2007). A alta expressão de HER2 em tumores mamários, o que não ocorre em tecidos normais, habilita a paciente para tratamento utilizando HER2 como alvo, sendo importante fator preditivo para a mulher (GUTIERREZ; SCHIFF, 2011; RESSEL et al., 2013).

Na cadela, HER2 pode ser expresso em tumores mamários malignos (BERTAGNOLLI et al., 2011; DE LAS MULAS; MILLÁN; DIOS, 2005; DUTRA et al., 2004; SOARES et al., 2017), com frequências relatadas de 19,1% (BURRAI et al., 2015), 29,7% (HSU et al., 2009) e correlaciona-se com pleomorfismo nuclear, alto grau histológico e índice mitótico (DUTRA et

al., 2004). Quanto a sobrevida, tumores HER2 positivos e negativos para RE e PR, apresentam sobrevida menor que seis meses pós cirurgia (MARTIN DE LAS MULAS et al., 2003).

No diagnóstico de câncer de mama humano é rotina a análise da expressão de RE, RP e HER2, visando a classificação molecular da neoplasia, definição da estratégia terapêutica e determinação do prognóstico (RAKHA; ELLIS, 2009). Na cadela, apenas nos últimos anos se iniciaram estudos sobre a classificação molecular dos TMC, que são escassos e ainda não há resultados consensuais (PEÑA et al., 2014).

A ausência de expressão de RE, RP e HER2 caracteriza o fenótipo triplo negativo. Este fenótipo constitui um dos grupos de tumores mais desafiadores na mulher (REIS-FILHO; TUTT, 2008) e também na cadela (KIM et al., 2013), devido a sua heterogeneidade clínica, fenotípica e genotípica. Na mulher este fenótipo está relacionado a histologia tumoral agressiva, prognóstico ruim, presença de metástases e recidivas (BAUER et al., 2007).

Tumores triplo negativo na cadela também apresentaram comportamento agressivo, prognóstico desfavorável e redução de sobrevida. As metástases foram identificadas em linfonodos (ABADIE et al., 2018; KIM et al., 2013), pele, fígado, pulmão e alguns casos apresentaram recidivas (VARALLO, 2016). O risco de morte em cadelas com este fenótipo tumoral pode ser associado ao tamanho tumoral, processo inflamatório peritumoral (ABADIE et al., 2018) e sobretudo, a presença de metástases (ABADIE et al., 2018; VARALLO, 2016).

Tendo o exposto, os objetivos deste trabalho foram: verificar a expressão de RE e a frequência do fenótipo triplo negativo em carcinomas mamários e correlacioná-las com características clinicopatológicas, sobrevida global, intervalo livre de doença e tempo de desenvolvimento de tumor em mama remanescente em cadelas.

2. Revisão de Literatura

2.1- Anatomia, histologia e desenvolvimento da glândula mamária

A glândula mamária é uma glândula sudorípara exócrina modificada, túbulo-alveolar composta, especializada na produção e secreção de leite, característica específica dos mamíferos (RESSEL et al., 2013).

A cadela possui dez glândulas mamárias, dispostas em pares, desde a região torácica até a região inguinal. Estas são designadas, no sentido craniocaudal: torácicas craniais e caudais,

abdominais craniais e caudais e inguinais (NAV, 2017). Ou ainda, de acordo com localização anatômica, as glândulas mamárias são numeradas: 1 corresponde às glândulas torácicas craniais (T1), o número 2 às torácicas caudais (T2), o 3 às abdominais craniais (A3), o 4 às abdominais caudais (A4) e o 5 às inguinais (I) (TYLER, 2002).

Cada mama é constituída de um teto e um corpo que são recobertos por pele. Em um corte longitudinal passando pela papila e pelo corpo da glândula, pode-se observar o corpo, constituído principalmente pela glândula mamária, dividida em septos conjuntivos, os lobos, que se dividem em lóbulos. Ductos excretores correm em direção à papila que se reúnem e formam os ductos lactíferos, para finalmente abrirem em uma cavidade denominada seio lactífero, espaço de coleta e armazenamento de leite. O seio constitui-se de parte glandular, no corpo da mama e parte papilar. A parte papilar do seio lactífero comunica-se com o exterior por meio de um estreito canal, o ducto papilar (FRAPPIER, 2012; REESE et al., 2016).

Histologicamente, as unidades funcionais da glândula mamária são os alvéolos que se encontram agrupados em lóbulos. O epitélio de revestimento dos alvéolos e ductos é constituído por uma população dupla de células: uma camada interna de epitélio simples cúbico, cuja morfologia celular varia consoante os diversos estádios de atividade secretora; uma camada externa de células mioepiteliais, cuja função é a contrair-se sob ação da ocitocina, promovendo a expulsão do leite (FRAPPIER, 2012).

Os lóbulos mamários encontram-se separados entre si por tecido conjuntivo, sendo este fibroso, moderadamente denso. Já o tecido conjuntivo que reveste os ductos alveolares, denominado tecido intralobular, é menos denso e mais celular. Os constituintes celulares inflamatórios habituais do tecido intralobular são linfócitos e plasmócitos (FRAPPIER, 2012).

A irrigação sanguínea das glândulas mamárias das cadelas provém dos ramos intercostais das artérias torácica interna, intercostal e torácica lateral (glândulas torácicas craniais e caudais); da artéria epigástrica cranial superficial (glândula abdominal cranial), e das artérias epigástrica superficial caudal com irrigação complementar pelo ramo da artéria labial ventral (glândulas abdominais caudais e inguinais) (LUIZ; MIGLINO; SANTOS, 2002). A drenagem venosa das glândulas é similar à irrigação arterial, contudo pequenas veias podem cruzar a linha média entre as glândulas direita e esquerda (SORENMO et al., 2011; REESE et al., 2016).

A drenagem linfática das mamas torácicas craniais e caudais é feita para os linfonodos axilares e das mamas abdominais caudais e mamas inguinais para os linfonodos inguinais superficiais. As mamas abdominais craniais podem apresentar drenagem mista (linfonodo axilar e inguinal). Essa drenagem pode sofrer variação individual, assim como ser influenciada

pelo estágio da lactação ou presença de massa tecidual e/ou obstrutiva (BRAGULLA e KÖNIG, 2004).

Na presença de neoplasia mamária pode ocorrer alteração na drenagem linfática padrão, formando novos canais de drenagem aumentando a rede vascular linfática. Assim há o recrutamento de maior número de linfonodos e dessa forma, pode haver “shunts” entre as cadeias contralaterais (PEREIRA et al., 2003).

O desenvolvimento da glândula mamária na cadela, assim como nos outros mamíferos é influenciado por fatores genéticos e hormonais. Na mamogênese, o desenvolvimento inicial do botão mamário está sob influência do mesênquima embrionário e os hormônios envolvidos são hormônio do crescimento e esteroides adrenais. Na vida pós-fetal, o desenvolvimento desta glândula inicia-se na puberdade, juntamente com a atividade ovariana (KLEIN, 2014; GORDEN e TIMMS, 2017). As alterações características do ciclo estral da cadela levam ao crescimento e proliferação da glândula mamária em cada ciclo, mesmo quando não há procriação (REESE et al., 2016).

Na puberdade, o estrógeno, o hormônio do crescimento e os esteroides da adrenal são responsáveis pela proliferação ductal. Porém, para o desenvolvimento dos alvéolos na porção terminal dos ductos, a prolactina e a progesterona são essenciais (KLEIN, 2014). Apesar deste desenvolvimento inicial na puberdade, a glândula mamária permanece relativamente subdesenvolvida até o final da gestação, quando sua estrutura estromal de tecido conjuntivo transforma-se em uma rede de células alveolares que sintetizam e secretam leite ativamente. Este fato deve-se principalmente ao aumento dos níveis de prolactina juntamente com esteroides da adrenal (KLEIN, 2014; GORDEN e TIMMS, 2017).

2.2- Epidemiologia, classificação e graduação histológica de tumores mamários em cadelas

Os tumores mamários caninos (TMC) estão entre as afecções mais comuns e representam 50 a 70% das neoplasias diagnosticadas em cadelas adultas ou idosas e intactas (GOLDSCHMIDT; PEÑA; ZAPPULLI, 2017; SORENMO et al., 2011). Mais de 50% dos casos de neoplasias são malignos (SORENMO et al., 2013), porém no Brasil a incidência é maior, com cerca de 90% dos TMC malignos (GAMBA et al., 2017). As neoplasias mamárias apresentam grande heterogeneidade em termos de morfologia e comportamento biológico (CASSALI, 2017; SLEECKX et al., 2011).

Cadelas adultas ou idosas são as mais acometidas, sendo nove e dez anos as idades médias mais reportadas (RIBAS et al., 2012; SILVA; SERAKIDES; CASSALI, 2004; SORENMO et al., 2011; ZUCCARI et al., 2008). Quanto às raças, estas podem sofrer variações de acordo com a região estudada (DOBSON, 2013). Além disso, considerando que grande parte da população de cães no Brasil é mestiça, torna-se difícil definir a susceptibilidade de alguma raça específica (KAMIGUCHI; MOREIRA, 2015). Contudo há relatos de maior incidência nas raças Poodle, Pastor Alemão, Cocker Spaniel, Maltês, Yorkshire e Dachshund (DOBSON, 2013; SORENMO et al., 2011).

As glândulas mamárias abdominais caudais e inguinais são as mais afetadas. Múltiplos tumores são encontrados em 50% a 70% das cadelas com neoplasias mamárias (MISDORP, 2002; SORENMO et al., 2009; SORENMO et al., 2013) e tipos histológicos diferentes podem estar presentes em um mesmo tumor (RUTTEMAN; WITHROW; MACEWAN, 2001).

No caso de TMC malignos, os pacientes apresentam metástase em linfonodo em mais de 25% dos casos (OLIVEIRA FILHO et al., 2010). Os locais de eleição para metástases são os linfonodos regionais (via drenagem linfática) e os pulmões, devido ao intenso fluxo de sangue que passa por este órgão (DE NARDI et al., 2013).

Neoplasias mamárias são classificadas de acordo a origem das células e também quanto ao comportamento em benignas e malignas. Em relação à origem, esta pode ser epitelial, mesenquimal ou mista. Neoplasias mistas apresentam proliferação de tecido epitelial e mesenquimal, mais tarde podem sofrer metaplasia cartilaginosa ou óssea (CASSALI et al., 2017). A diferenciação entre tumores malignos e benignos se baseia na característica e arranjo celular, invasão de estruturas teciduais adjacentes, pleomorfismo e presença ou ausência de componentes mesenquimais não neoplásicos (SORENMO; DEANNA; GOLDSCHMIDT, 2013). Além disso, as características macroscópicas como o tamanho, tempo de crescimento e evolução, ulceração, aderência à pele e tecidos subjacentes, são critérios que podem sugerir malignidade ou benignidade da neoplasia (MISDORP, 2002).

A classificação histológica é considerada fator de prognóstico para TMC e, ao longo do tempo, várias classificações e atualizações têm sido propostas com a finalidade de se estabelecer um adequado prognóstico associado ao tipo histológico do TMC (RASOTTO et al., 2017). A primeira classificação histológica para os tumores mamários caninos, publicada em 1974 pela Organização Mundial de Saúde incluía neoplasias e displasias da glândula mamária, baseada em classificações propostas por três estudos anteriores (MISDORP et al., 1971, 1972, 1973).

Esta classificação posteriormente sofreria modificações publicadas por Misdorp et al. (1999, 2002).

Cassali et al. (2011), baseado na classificação de Misdorp et al. (1999), propuseram uma nova classificação histológica que enfatiza a metaplasia cartilaginosa ou óssea, que diferentemente da mulher, é muito frequente na cadela (CASSALI et al., 2011). Esta mesma classificação foi reavaliada em 2013 (CASSALI et al., 2014).

Goldschmidt et al. (2011) também propuseram uma classificação para os TMC baseada na classificação da OMS de 1974 e 1999. As neoplasias, de acordo com esta classificação foram divididas em: epitelial maligna, tipos especiais de neoplasia epitelial maligna, mesenquimais malignas, mista maligna, hiperplasia/displasia, neoplasias de teto e hiperplasia ou displasia do teto (GOLDSCHMIDT et al., 2011). Esta classificação atualmente também foi reavaliada e as lesões mamárias foram classificadas em: neoplasias benignas (adenoma – simples e complexo (adenomioepitelioma), adenoma ductal, fibroadenoma, mioepitelioma, adenoma papilar intraductal, adenoma ductal com diferenciação escamosa e tumor misto benigno) e malignas (epiteliais, mesenquimais e mistas). Dentre as neoplasias mamárias epiteliais malignas tem-se o carcinoma *in situ*, os carcinomas simples (tubular, tubulopapilar, cístico-papilar e cribiforme), o carcinoma complexo, micropapilar invasor, sólido, comedocarcinoma, anaplásico, carcinoma em tumor misto, mioepitelioma maligno, carcinoma ductal e intraductal papilar, além de tipos especiais de neoplasias malignas epiteliais e neoplasias malignas de origem mesenquimal (sarcomas) (GOLDSCHMIDT; PEÑA; ZAPPULLI, 2017).

A graduação histológica tem correlação com prognóstico nos tumores mamários caninos (TORÍBIO et al., 2012). O sistema Nottingham, também denominado método de graduação histológica de Scarff-Bloom-Richardson (SBR) modificado em 1991 (ELSTON; ELLIS, 1991), foi descrito para graduação histológica de tumores de mama em mulher. Segundo Cassali et al. (2014) o número de pesquisadores veterinários que adotaram os critérios de graduação histológica propostos por Nottingham (ELSTON; ELLIS, 1998) para avaliar carcinomas de mama em cães aumentou. Neste sistema de classificação a determinação do grau histológico é realizada avaliando-se três características tumorais: formação tubular (1 ponto: mais que 75% do tumor constituído por túbulos, 2 pontos: entre 10% e 75% de formação tubular e 3 pontos: túbulos em menos de 10% do tumor); o pleomorfismo nuclear (1 ponto: núcleo pequeno e regular, 2 pontos: moderada variação nuclear e aumento de tamanho celular e 3 pontos: grande variação no tamanho e formato da célula); e o número de mitoses, avaliado em objetiva de 40x em 10 campos (1 ponto: 0-8 mitoses, 2 pontos: 9-16, e 3 pontos: mais de 17 mitoses). Assim, o

grau é determinado pelo somatório de pontos de acordo com as características avaliadas. O grau I é determinado quando se somam de 3 a 5 pontos, em grau II para 6-7 pontos e grau III para 8-9 pontos.

A graduação histológica segundo Goldschmidt et al. (2017) segue os mesmos parâmetros, diferindo apenas quanto a avaliação do número de mitoses (1 ponto: 0-9; 2 pontos: 10-19 e 3 pontos: ≥ 20 mitoses). Tumores de baixo grau histológico estão associados a período livre de doença mais longo e com menor taxa de recorrência, quando comparados a tumores de alto grau (KARAYANNOPOULOU et al., 2005). Estudos relataram maior taxa de ocorrência de metástases em carcinomas mamários grau III, comparados aos de grau I e II (DIAS et al., 2016; DOLKA; KRÓL; SAPIERZYŃSKI, 2016; GUNDIM et al., 2016).

2.3- Influência hormonal na carcinogênese mamária

Alguns fatores associados à etiologia das neoplasias mamárias são propostos, como a influência da dieta e obesidade (LIM et al., 2015), transcrição gênica, componentes genéticos, estresse oxidativo e principalmente, a influência hormonal (SILVA; SERAKIDES; CASSALI, 2004; ZUCARI et al., 2001).

O componente etiológico hormonal é o principal elemento estudado, principalmente pelo risco de aparecimento desse tumor nas cadelas castradas antes do primeiro cio ser de 0,05%, após o primeiro cio 8% e após o segundo, o risco aumenta para 26% (FONSECA; DALECK, 2000; SCHNEIDER; DORN; TAYLOR, 1969). Estrógeno, progesterona, prolactina e hormônio do crescimento são os principais hormônios envolvidos no desenvolvimento das neoplasias mamárias em cadelas (MISDORP, 2002). Tanto na mama normal como na neoplásica, o crescimento tecidual é estimulado por hormônios e fatores de crescimento e acredita-se que, diferentemente de outras neoplasias, a proliferação celular do tumor de mama não necessita de um agente iniciador específico, pois, os hormônios induzem a proliferação, com mutação gênica e por fim, a formação neoplásica (GOLDSCHMIDT; PEÑA; ZAPPULLI, 2017; MISDORP, 2002).

O ciclo estral da cadela é caracterizado por uma longa fase de secreção de progesterona dependente de hormônio luteinizante hipofisário e prolactina. Nesta fase, é comum a cadela apresentar a pseudociese. Após sete dias do final dessa fase, os níveis de progesterona diminuem e há o aumento da concentração de estrógeno e prolactina. Nas pseudocieses

recorrentes ou após a lactação, as concentrações de prolactina estão elevadas e causam retenção láctea e possível formação de neoplasias mamárias (MARTINS e LOPES, 2005).

A prolactina facilita a ação mitótica de estrógeno (KOJIMA et al., 1996) e este, promove o crescimento celular por estimulação de fator de crescimento tumoral α , fator de crescimento semelhante à insulina e por inibição do fator de crescimento tumoral β (MISDORP, 2002). Além disso, a possibilidade de a prolactina também estimular a atividade mitótica de células epiteliais da glândula mamária, não pode ser descartada (MULDOON, 1981).

Na mulher, nos três primeiros meses de gravidez, os elevados níveis de estrógeno, predis põem a possível desenvolvimento de câncer de mama. Todavia, com o transcorrer da gestação, globulinas que transportam esteroides são produzidas, reduzindo os níveis plasmáticos de estrógeno e protegendo a glândula mamária (HENDERSON; ROSS; PIKE, 1993). Este efeito protetor não é observado na cadela (RUTTEMAN; WITHROW, 2001).

A progesterona, na puberdade e na gestação, participa ativamente no desenvolvimento mamário, mas isoladamente, não pode ser considerada como carcinogênica. Entretanto quando associado a outros fatores, como o estrógeno, apresenta um papel importante no desenvolvimento dos tumores mamários, devido ao estímulo proliferativo (KIM et al., 2014; MISDORP, 2002).

Por isto, o uso prolongado, ou em altas doses, de progestágenos é associado ao desenvolvimento de tumor de mama em cadelas. A progesterona exógena estimula a síntese de hormônio do crescimento na glândula mamária, proliferação lóbulo-alveolar e conseqüente hiperplasia de elementos mioepiteliais e secretórios, induzindo a formação de nódulos benignos em animais jovens (RUTTEMAN et al, 2001), ou ainda, displasia ou metaplasia em adultos (MISDORP, 2002).

Na mulher e na cadela, expressão de receptores hormonais é verificada por imunohistoquímica ou ainda, PCR. Tumores benignos expressam maior número de receptores para progesterona (RP) e receptores de estrógeno (RE), enquanto os carcinomas malignos apresentam menor concentração destes (MILLANTA et al., 2005; YAMASHITA et al., 2006). Resultados de percentuais de marcação de RE e PR são variáveis e inconclusivos apresentando percentuais de marcação positiva para RE que variam de 10% a 92,3%. Enquanto que para RP variam de 23,80 a 71,9% (PEÑA et al., 2014). Este percentual de marcação é considerado baixo quando se compara a expressão de RE (68,8% a 81%) e RP (61% a 70%) tumores de mama de mulheres (HAMMOND et al., 2010).

A expressão de RE parece diminuir em cadelas idosas com carcinomas malignos ou indiferenciados de alto grau (CHANG et al., 2009; DE LAS MULAS; MILLÁN; DIOS, 2005) e a associação destas características resulta em prognóstico ruim, tanto na cadela como na mulher (DE LAS MULAS; MILLÁN; DIOS, 2005; NIETO et al., 2000; YAMASHITA et al., 2006).

Chang et al. (2009) avaliaram a expressão de RE e RP em tumores mamários de cadelas e verificaram que dentre estes dois hormônios, a expressão de PR é que pode ser considerada como melhor fator prognóstico, sendo que cadelas que apresentam menor expressão de PR tem menor sobrevida. Estes autores ainda verificaram que a sobrevida era menor em tumores de cadelas com neoplasias mamárias RE positivas e RP negativas.

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 (FONSECA; DALECK, 2000). O estrógeno pode atuar por ligação a RE presente em células epiteliais e estromais da glândula mamária induzindo nestas células uma expressão aumentada de RP. Dentro desta 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 (MILLANTA et al., 2005).

Os receptores de esteroides, RE e RP são membros da superfamília de receptores nucleares e são considerados potentes fatores prognósticos para carcinomas de câncer de mama humano (CHANG et al., 2009; NIETO et al., 2000). A expressão de RE está intimamente relacionada com a carcinogênese, além de seu valor prognóstico e preditivo para a resposta à terapia endócrina em mulheres (YAMASHITA et al., 2006). Neoplasias mamárias em mulheres com negativa ou baixa expressão de RE e PR não são sensíveis a terapia endócrina e estão associadas a desfecho clínico desfavorável (OSBORNE et al., 2005).

Na cadela, a relação da expressão dos receptores hormonais e o prognóstico assemelha-se à mulher. De las Mulas et al. (2005) mostraram que tumores com expressão RE e PR estavam associados a um maior tempo livre de doença do que os tumores que não expressaram ambos os receptores. Ainda Chang et al. (2009) mostraram que os tumores com o fenótipo RE+ e PR+ tiveram as maiores taxas de sobrevida quando comparadas outros fenótipos.

Na mulher, cânceres de mama que expressam RE e PR demonstraram ter resultados favoráveis, mas as características dos tumores que expressam apenas um desses receptores não está bem definido (RAKHA et al., 2007). Tumores com um RE + e PR- são resistentes à terapia

endócrino apesar da positividade para estrógeno (THAKKAR; MEHTA, 2011). A perda da expressão de RP implica que a função RE normal esteja comprometida e conseqüentemente, diminui a resposta ao tamoxifeno, quimioterápico antagonista RE (CUI et al., 2005). A existência de tumores com RE- e PR + é controversa, pois a expressão de PR é tipicamente conhecida sob condições em que o receptor de estrógeno é positivo (CSERNI et al., 2011; DE MAEYER et al., 2008).

Na cadela, também há ocorrência de tumores que expressam apenas estrógeno ou progesterona e, assim como na mulher, a existência desta característica nas neoplasias mamárias, ainda não é bem esclarecida. Todavia, estudo baseado em imunohistoquímica e PCR, avaliou a expressão de RE e PR em carcinomas mamários de cadelas (KIM et al., 2014). Estes autores verificaram que 11,80% das amostras de neoplasias não expressaram RE, contudo foram positivas para PR. Quanto a expressão gênica, tumores RE- e PR+ apresentaram moderada expressão de estrógeno (KIM et al., 2014).

Alguns estudos sugerem que na mulher, tumores mamários RE- e PR+ representam 1,5 a 3,4% dos casos. Na cadela este percentual apresenta ampla variação: 0% (MILLANTA et al., 2005), 16% (MANEE-IN et al., 2008), 25,3% (CHANG et al., 2009) e 43% (DE LAS MULAS; MILLÁN; DIOS, 2005). Uma possível razão para esta discrepância de resultados na cadela, é a diversidade de anticorpos primários utilizados e suas respectivas sensibilidades, pois considerando que a expressão de PR é dependente da RE, o anticorpo não apresentou sensibilidade para identificar alguns epítomos expressos pelo tumor (KIM et al., 2014). Ademais, a não expressão de RE ou PR pode estar relacionada à detecção limitada do anticorpo, ou ainda, a ligação defeituosa do ligante para variantes de RE (FUQUA et al., 1991; MCGUIRE; CHAMNESS; FUQUA, 1991).

Quando se verifica a expressão gênica de RE em neoplasias negativas para este hormônio, acredita-se nas limitações que a imunohistoquímica pode oferecer, pois este resultado não indica a ausência de RE, mas que há uma baixa expressão citoplasmática ou nuclear. A imunohistoquímica pode negligenciar estes níveis de RE baixos ou limítrofes, (KIM et al., 2014). Este fato, também é observado em estudos com RNA em neoplasias mamárias de mulheres que não expressaram RE, todavia expressaram PR (IWAO et al., 2000; KONECNY et al., 2003).

São escassos os estudos avaliando a relação entre expressão de RE e sobrevida em cadelas e os resultados são controversos, assim o papel do estrógeno como fator de prognóstico

em cadelas ainda não foi esclarecido. Nieto et al. (2000) verificaram que a expressão de RE, índice Ki-67 e a idade foram fatores independentes que poderiam prever a sobrevida livre de doença. Enquanto que o status do linfonodo, a idade e a expressão de RE foram fatores prognósticos independentes para a sobrevida global. Por outro lado, Millanta et al. (2005) relataram que tanto em cães como em gatos a expressão de RE e RP em carcinomas invasivos não se correlacionou com os parâmetros histológicos ou com o tempo de sobrevida global.

Ao avaliar a sobrevida, Kim et al. (2014) verificaram que os tumores mamários caninos que expressam RE e PR apresentam tipos histológicos menos agressivos, baixo grau histológico e ausência de metástase em linfonodos. Enquanto a não expressão para ambos hormônios foi verificada em neoplasias de alto grau histológico, com invasão linfática e necrose. Tumores com RE- e PR+ apresentam pior prognóstico quando comparados com RE+ e PR+ e melhor prognóstico em relação à RE- e PR- (KIM et al., 2014).

2.4- Expressão de HER2 e fatores de prognóstico

O oncogene *Human Epidermal Growth Factor Receptor-type 2* (HER2), também denominado c-erBb2 ou HER2/neu, codifica uma glicoproteína de membrana pertencente à família de receptores de fator de crescimento epidermal (DE LAS MULAS et al., 2003). Esta família é constituída por quatro proteínas transmembrânicas: HER1, HER2, HER3 e HER4, que funcionam como receptores e apresentam atividade tirosina-quinase.

Estes receptores são compostos por três domínios (extracelular, transmembranar e intracelular) (GUTIERREZ; SCHIFF, 2011) e têm papel essencial na regulação da proliferação celular, da sobrevivência, da diferenciação e da migração e na manutenção da função normal dos tecidos no adulto. A perda da regulação por parte destes receptores tem como consequência o surgimento de várias doenças, como o câncer (BAZLEY; GULLICK, 2005; WIEDUWILT; MOASSER, 2008). Na glândula mamária, ausência de HER2 na mamogênese inicial, implica em desenvolvimento deficiente de lóbulos, alvéolos e reduzida excreção láctea (ANDRECHEK; WHITE; MULLER, 2005; JONES; STERN, 1999).

Parece não existir um ligante específico para o sítio extracelular de receptores HER2, e ainda, esta proteína pode sofrer heterodimerização como outro membro da família HER ou formar homodímeros (HER2:2) de forma espontânea (EARP et al., 1995). Neste caso a proteína se torna ativada e é capaz de transduzir sinais intracelulares que podem afetar o crescimento

celular e desencadear eventos pré-neoplásicos como: inibição da apoptose, migração e invasividade celular, angiogênese e outros processos que levam a progressão de neoplasias malignas (HERBST, 2004; VLAHOVIC; CRAWFORD, 2003).

Na mulher, devido a possibilidade de tratamento e determinação de um prognóstico, a identificação de HER2 em tumores mamários é frequente e indispensável (GUTIERREZ; SCHIFF, 2011). O diagnóstico de tumores HER2 positivos pode ser realizado através de técnicas de hibridação fluorescente *in situ* (FISH), considerado um dos testes *gold standard* para determinação do *status* de HER2 (WOLFF et al., 2007). Outro método de diagnóstico é por meio de qRT-PCR, que apresenta limitações considerando a dificuldade de extração de RNA a partir de material em parafina (MOELANS et al., 2011). Por fim, a imunohistoquímica, técnica mais usada e padronizada para identificação do *status* HER2. Este método é considerado simples, rápido, fácil e relativamente acessível (MOELANS et al., 2011).

De acordo com a *guidelines* da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) (WOLFF et al., 2018), a análise da imunomarcação de HER2 para o câncer de mama na mulher, faz-se da seguinte maneira: o escore +3 (positivo)   atribuído no caso de imunomarcação intensa, uniforme e completa de membrana plasmática (*chicken-wire pattern*) em mais de 10% das células epiteliais da amostra tumoral. No escore +2 (resultado equívoco), marcação de membrana incompleta e/ou fraca/moderada, em mais de 10% das células tumorais; ou marcação da membrana completa, circunferencial e intensa, em menos 10% das células tumorais.   necessária confirmação com teste FISH. O escore +1 (negativo)   atribuído no caso de marcação fraca e incompleta de membrana plasmática, em mais de 10% de células epiteliais, e o escore 0 (negativo) quando não houve marcação de membrana plasmática ou esta é incompleta e dificilmente perceptível (WOLFF et al., 2018).

Em humanos, a superexpressão de HER2 é diagnosticado em 20 a 30% de cânceres de mama e está associado a aumento da agressividade tumoral, recidivas e mortalidade (SLAMON et al., 1987, 1989; WOLFF et al., 2007). Os tumores mamários na mulher podem apresentar de 25 a 50 cópias de genes HER2, aumentando a produção da proteína HER2 de 40 a 100 vezes, resultando na expressão de 2 milhões de receptores na superfície celular tumoral (KALLIONIEMI et al., 1992).

Na espécie canina, o gene HER2 está localizado no cromossomo 1q13.1, que frequentemente exibe alterações cromossomais clonais em tumores mamários caninos (MURUA ESCOBAR et al., 2001). Apesar da intensificação das pesquisas nas últimas décadas,

muitas das quais sugerem que esse biomarcador possui importante papel na carcinogênese mamária canina, o significado da superexpressão de HER2 em cadelas ainda é controverso (BERTAGNOLLI et al., 2011; BURRAI et al., 2015).

Na cadela, assim como na mulher, HER2 é frequentemente expresso em tumores mamários malignos (BERTAGNOLLI et al., 2011; BURRAI et al., 2015; DUTRA et al., 2004; HSU et al., 2009; DE LAS MULAS et al., 2003; SOARES et al., 2017). O percentual de superexpressão de HER2 em TMC é variável: 7,6% (RUNGSIPIPAT et al., 1999), 13,13% (SOARES et al., 2017), 13,6% (BERTAGNOLLI et al., 2011), 17,6% (DE LAS MULAS et al., 2003), 19,1% (RUNGSIPIPAT et al., 1999), 22% (BURRAI et al., 2015), 25,3% (DUTRA et al., 2004), 29,7% (HSU et al., 2009) e 35,3% (KIM et al., 2011). Ainda, alguns autores verificaram expressão de HER2 em tumores benignos de cadelas (KIM et al., 2011; RESSEL et al., 2013; RUNGSIPIPAT et al., 1999).

A variação na frequência de TMC com superexpressão de HER2 pode estar associada a fatores como: falta de padronização de metodologia na técnica de IHQ, ausência de padronização para análise das imunomarcações reduzida dimensão das amostras, fatores epidemiológicos, sensibilidade dos métodos de detecção, nível de expressão do gene (amplificação, transcrição, tradução) e estágios das amostras tumorais (BURRAI et al., 2015; HSU et al., 2009; MUHAMMADNEJAD et al., 2012). Além disso, outro fator a ser avaliado é que na detecção da expressão de HER2 por métodos imunohistoquímicos, utiliza-se anticorpo anti-HER2 humano. Estudos anteriores confirmaram a reatividade cruzada entre os anticorpos contra proteínas anti-humanos e tecidos caninos (HSU et al., 2009; MARTIN DE LAS MULAS et al., 2003; RUNGSIPIPAT et al., 1999). Contudo a ausência de imunomarcação ou ainda, marcação de intensidade variável em carcinomas mamários de cadelas, assim como, a presença de marcações inespecíficas identificadas no citoplasma celular ou imunomarcação de células hiperplásicas ou normais dentro da amostra tumoral, sugerem a inespecificidade do anticorpo (BURRAI et al., 2015).

Na oncologia humana, a imuno-histoquímica representa um método simples e confiável para examinar a expressão de marcadores moleculares (MOELANS et al., 2011), sendo capaz de fornecer resultados semelhantes a métodos-padrão, como hibridização fluorescente *in situ* (FISH) (KAYA et al., 2001; WOLFF et al., 2018). A elegibilidade de pacientes a serem submetidas a terapias específicas anti-HER2 utiliza como critério a superexpressão desta molécula, que pode ser avaliada tanto por imunohistoquímica como por FISH. A ASCO recomenda que a imunohistoquímica seja utilizada como método de triagem (uma vez que está

amplamente disponível para uso de rotina) e o FISH seja realizado como teste confirmatório em resultados duvidosos como escore +2 (WOLFF et al., 2018).

Ressel et al. (2013) acreditam que a probabilidade de existirem tumores mamários caninos com superexpressão de HER2 aumenta com o número de amostras analisadas. Ainda segundo esses autores, níveis anormais da proteína podem estar envolvidas no crescimento celular de alterações neoplásicas benignas e hiperplásicas (RESSEL et al., 2013).

Grande parte dos estudos sobre expressão de HER2 em tumores mamários de cadelas utiliza o sistema clássico de escore utilizado em câncer de mama humano, HercepTest®. Neste sistema de escore, a marcação fraca a moderada (escore +2) ou forte marcação (escore +3) observada em 10% de células marcadas é suficiente para se considerar uma amostra positiva para expressão de HER2.

Assim, vários estudos que descrevem expressão elevada de HER2 em carcinomas de cadelas, utilizaram o HercepTest® e consideraram o escore +2 de marcação como positivos (DUTRA et al., 2004; IM et al., 2014; MARTIN DE LAS MULAS et al., 2003; RESSEL et al., 2013). Entretanto, quando o escore +2 é considerado positivo há maior número de casos falso positivos, quando reavaliados por FISH (WOLFF et al., 2018). Apesar do gene que expressa HER2 estar em cromossomos diferentes, Singer et al. (2012) verificaram homologia de sequências proteicas de HER2 canino e do seu homólogo em humanos. Estes autores descobriram 92% de homologia entre as proteínas nas duas espécies. Além disso, o local de ligação do trastuzumab é igual em ambos os receptores, com a exceção de um aminoácido. Este fato apoia a possibilidade do uso de imunoterapia como tratamento de neoplasias mamárias em cadelas, assim como o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas com base na medicina comparada (SINGER et al., 2012).

A heterogeneidade das neoplasias mamárias pode ser identificada pela variação intratumoral de marcação de HER2, que representa a diversidade subclonal dentro do tumor, já relatada na mulher (VANCE et al., 2009). Este conceito deve-se estender ao carcinoma mamário canino (PEÑA et al., 2014). Estudo revelou que as mulheres com heterogeneidade intratumoral de marcação para HER2, há uma diminuição do tempo de sobrevida livre da doença, sugerindo que a instabilidade e a amplificação de subclones de HER2 nos tumores, podem estar associados à progressão do câncer de mama (SEOL et al., 2012). Este fenômeno deve ser levado em consideração por pesquisadores veterinários, pois pode aumentar a subjetividade na interpretação de HER2 (PEÑA et al., 2014). Sendo assim, a avaliação deve ser

preferencialmente realizada em amostras tumorais inteiras e representativas (SEOL et al., 2012).

Na mulher o valor prognóstico da expressão de HER2 é bem esclarecido. Neoplasias positivas para este biomarcador de membrana está relacionado com fatores de prognósticos e preditivos (GUTIERREZ; SCHIFF, 2011; ROSS; FLETCHER, 1998). Ainda, quanto maior amplificação gênica de HER2 no câncer de mama humano, menor sobrevida global e tempo livre de doença (SLAMON et al., 1989). Na cadela, estudos vêm sendo conduzidos no sentido de se identificar o real envolvimento de HER2 como fator prognóstico nas lesões mamárias caninas (PEÑA et al., 2014).

Alguns estudos com carcinomas mamários caninos correlacionaram a expressão de HER2 por meio de imunohistoquímica com fatores clinicopatológicos, ou ainda, com a sobrevida de cadelas. Dutra et al. (2004) verificaram que neoplasias com pleomorfismo nuclear, alto grau histológico e índice mitótico apresentam expressão de HER2, sendo assim, considerados fatores de prognóstico. Martin de las Mulas et al. (2003) afirmaram que neoplasias sólidas, maior que três centímetros, de alto grau histológico, crescimento invasor, com metástases, positivas para HER2 e negativas para RE e PR, apresentam sobrevida menor que seis meses pós cirurgia. Ainda, carcinomas simples, com metástase em linfonodo na primeira cirurgia apresentam maior expressão de HER2 (ARAÚJO et al., 2016; IM et al., 2014; RUNGSIPIPAT et al., 1999).

Por outro lado, Hsu et al. (2009) observaram maior sobrevida em cadelas com expressão de HER2. Estes autores sugerem que o HER2 desempenha um papel na formação dos tumores, mas que o desenvolvimento de malignidade, especificamente, pode não estar associado ao aumento dos níveis de expressão desta proteína. Outros estudos não verificaram nenhuma relação entre a expressão de HER2, com fatores de prognóstico (tamanho tumoral, tipo histológico, graduação histológica, TNM) (RESSEL et al., 2013; SOARES et al., 2017) e tempo global de sobrevida das cadelas (RESSEL et al., 2013). Estes autores acreditam que o aumento da expressão desta proteína não está associado ao período livre de doença na espécie canina, como ocorre nas mulheres (RESSEL et al., 2013).

2.5- Fenótipo triplo negativo e fatores de prognóstico na mulher e na cadela

O câncer de mama tanto na mulher como na cadela, é caracterizado como uma doença heterogênea e que apresenta diferentes características biológicas e comportamento clínico (PEÑA et al., 2014; RAKHA; ELLIS, 2009). A heterogeneidade tumoral é considerada um desafio para patologistas e oncologistas que buscam o avanço no diagnóstico e no tratamento do câncer mamário na mulher. Por este motivo, há uma necessidade de identificar as classes de tumores, com diferentes comportamentos ou capacidade de resposta a terapias específicas (RAKHA; ELLIS, 2009). Esta identificação é possível por meio da expressão molecular de receptores hormonais, RE e PR, e de HER2, moléculas consideradas principais determinantes moleculares no câncer de mama humano (RAKHA et al., 2007).

No diagnóstico de câncer de mama humano é rotina a análise da expressão de RE, RP e HER2, visando a classificação molecular da neoplasia, definição da estratégia terapêutica e determinação do prognóstico (RAKHA; ELLIS, 2009). Na cadela, apenas nos últimos anos se iniciaram estudos sobre a classificação molecular dos TMC, que são escassos e ainda não há resultados consensuais (PEÑA et al., 2014).

A ausência de expressão de RE, RP e HER2 caracteriza o fenótipo triplo negativo. Constitui um dos grupos de tumores mais desafiadores na mulher (REIS-FILHO; TUTT, 2008) e também na cadela (KIM et al., 2013), devido a sua heterogeneidade clínica, fenotípica e genotípica. Na mulher, este fenótipo é relevante pela ausência de terapia específica, agressividade, comportamento clínico e prognóstico ruim (BAUER et al., 2007; RAKHA; ELLIS, 2009; SHAO; BROWN, 2004).

Na mulher, o triplo negativo representa 10 a 17%, das neoplasias mamárias (BAUER et al., 2007; PALMA et al., 2015). Acomete mulheres jovens, de 47 a 50 anos, na pré menopausa (RAKHA et al., 2007; YANG et al., 2007), apresentam-se macroscopicamente em forma de massa palpável, invasiva (LIN et al., 2012a; NEWMAN et al., 2015) aparentes no exame de mamografia (DOGAN et al., 2010). A relação de desenvolvimento de tumores triplos negativos em mulheres com fatores como: idade de menarca, parição e uso de contraceptivos orais, ainda não são bem esclarecidos (BOYLE, 2012).

Quanto a histologia, na mulher, os tumores triplo negativos são carcinomas ductais invasivos, de alto grau histológico, alto índice mitótico, com áreas de necrose central e infiltrado linfocítico (BAUER et al., 2007; NEWMAN et al., 2015; RAKHA et al., 2006). Tumores triplo

negativos podem apresentar de 60 a 90% e 16 a 23% de mutação no genes BRCA1 e BRCA2 respectivamente, culminando na progressão tumoral (COUCH et al., 2015).

A agressividade deste fenótipo tumoral, na mulher, é ilustrada na recorrência que ocorre de um a três anos, metástase visceral (pulmão ou cérebro) em cinco anos após o diagnóstico, redução em 10 anos na sobrevida quando comparado a outros tipos moleculares tumorais; e morte nos primeiros cinco anos após terapia (DENT et al., 2007; LIN et al., 2012).

Em medicina veterinária, o fenótipo triplo negativo não está bem caracterizado em cadelas e estudos mais amplos devem ser realizados (KIM et al., 2013). Na cadela, tumores triplo negativo são grandes, com média de 18mm±7mm (ABADIE et al., 2018), histologicamente classificados como carcinomas simples e complexos, de alto grau (ABADIE et al., 2018; KIM et al., 2016, 2013; VARALLO, 2016), invasivos, apresentando áreas de necrose, alto índice mitótico e infiltrado inflamatório linfocítico (ABADIE et al., 2018; KIM et al., 2013). A frequência do fenótipo triplo negativo em cadelas é variável: 15,5% (KIM et al., 2016), 18,7% (KIM et al., 2013) e 76,3% (ABADIE et al., 2018) e parece acometer cadelas intactas e idosas, com mais de 10 anos (ABADIE et al., 2018; GAMA; ALVES; SCHMITT, 2008; KIM et al., 2016, 2013).

Tumores triplo negativo na cadela também apresentaram comportamento agressivo, prognóstico desfavorável e redução de sobrevida. As metástases foram identificadas em linfonodos (ABADIE et al., 2018; KIM et al., 2013), pele, pulmão e fígado, além disso há relatos de recidivas tumorais (VARALLO, 2016). Abadie et al. (2018) em análise multivariada, verificaram que o estadiamento clínico, a marcação positiva para Ki67 e processo inflamatório tumoral, são potentes fatores de prognóstico em cadelas com tumores triplo negativo. Varallo (2016) identificou 53% de cadelas com tumores triplo negativos em estadiamento III, IV e V; e estes animais morreram 274 dias após diagnóstico da neoplasia.

Apesar do pior prognóstico de tumores triplo negativo em mulheres, estudos indicam que clinicamente não são todos os tumores triplo negativos que apresentam características morfológicas semelhantes ou comportamento agressivo (BERTUCCI et al., 2008; CHEANG et al., 2008; TAN et al., 2008). Apesar do status nodal neste tipo de tumor ainda ser controverso, há relatos que os linfonodos são órgãos menos propensos a apresentar metástases em cânceres triplo negativo (FOULKES et al., 2009; LIN et al., 2012), além disso, o status nodal não se correlaciona com o tamanho tumoral, como fator de prognóstico nos tumores triplo negativo que expressam marcadores basais (FOULKES et al., 2009).

Assim como na mulher, estudos indicam que a sobrevida é reduzida em neoplasias triplo negativo em cadelas. O risco de morte em cadelas com este fenótipo tumoral é predito pelo tamanho tumoral, o processo inflamatório peritumoral (ABADIE et al., 2018) e sobretudo, a presença de metástases tanto em linfonodos como à distância, o que pode culminar na morte dos animais (ABADIE et al., 2018; VARALLO, 2016). Além disso, a expressão de moléculas como Ki67, p-caderina, p63 e p53 também corroboram com o prognóstico desfavorável dos tumores triplo negativo em cadelas (ABADIE et al., 2018; GAMA; ALVES; SCHMITT, 2008; MATOS et al., 2005).

Por meio de análise de microarranjos de DNA, vários grupos propuseram uma nova taxonomia para o câncer de mama na mulher, com base em características moleculares. Sendo assim cinco grupos foram determinados: luminal A, luminal B, superexpressão de HER2, basal like e normal like (PEROU et al., 2000; RAKHA; REIS-FILHO; ELLIS, 2008; SØRLIE et al., 2001).

A caracterização molecular no câncer de mama, na cadela e na mulher são determinados primordialmente pela expressão de receptores hormonais (RE) e HER2 (GAMA; ALVES; SCHMITT, 2008; NIELSEN et al., 2004; REIS-FILHO; TUTT, 2008). Os tumores serão classificados como luminais A (RE+/HER2-), luminais B (RE+/HER2+) e superexpressão de HER2 (RE-/HER2+). Na cadela, tumores que não expressam receptores hormonais e HER2 são classificados como basal like ou normal like. Para a definição entre estes dois últimos grupos, na mulher e na cadela, faz-se necessária a investigação de marcadores de células basais/mioepiteliais, como: citoqueratinas (CK): CK5/6, CK14, CK17, CK8/18, fator de crescimento epidérmico (EGFR), vimentina, p-caderina, p63, associados à marcadores de prognóstico como p53, Ki67 (GAMA; ALVES; SCHMITT, 2008; KIM et al., 2013; MATOS et al., 2005; NIELSEN et al., 2004).

Com a introdução do tipo molecular basal like, o qual não há expressão de RE, RP e HER2, resultou em confusão quanto à definição deste tipo molecular e o fenótipo triplo negativo, devido a semelhança de características clínicas e o comportamento desses tumores (BADVE et al., 2011; RAKHA; ELLIS, 2009; REIS-FILHO; TUTT, 2008).

Os carcinomas classificados como basal like caracterizam-se pela não expressão de receptores hormonais e HER2. Representam de 8% a 37% dos cânceres de mama na mulher, com idade de 47 a 55 anos, na pré menopausa (CAREY et al., 2007; RAKHA; ELLIS, 2009; YANG et al., 2007). Tumores basais acometem cadelas idosas com média de 9 anos e as

frequências são: 22,2% (SASSI et al., 2010), 24,5% (IM et al., 2014) e 29,2% (GAMA; ALVES; SCHMITT, 2008); consideradas semelhante a mulher (CHEANG et al., 2008).

Por apresentarem características clínicas, morfológicas e fenotípicas semelhantes como: idade de pacientes acometidas, tipo e grau histológico, invasividade, expressão p53, mutações em BRCA1 ou no gene TP53, altos índices de proliferação, comportamento agressivo e mau prognóstico; alguns autores defendem que o fenótipo triplo negativo, na mulher e na cadela, pode confiavelmente ser usado como um substituto para o basal like (CAREY et al., 2007; DENT et al., 2007; HAFPTY et al., 2006; KREIKE et al., 2007; PEROU et al., 2000).

Contudo, para Rakha e Ellis (2009), tumores tipos basal like e triplo negativo são fenótipos diferentes no câncer de mama humano. Estes mesmos autores afirmam que o fenótipo triplo negativo não é ideal para identificação de cânceres de mama basal like. A compreensão da definição, dos mecanismos oncogênicos e terapêuticos, para o triplo negativo e para os tumores basal like, poderá levar ao melhor entendimento sobre estes tipos de tumores, tanto na mulher como na cadela (KIM et al., 2013; RAKHA; ELLIS, 2009).

Tumores mamários basais são classificados pela ausência de expressão de RE, RP e HER2, sobretudo a imunomarcção positiva para marcadores basais (CK5/6, CK14, CK17 e /ou EGFR). A imunexpressão de marcadores basais em mulheres e cadelas, está associado a características morfológicas específicas (alto grau), imunofenotípicas (reatividade para p53), mutações em BRCA1 e prognóstico ruim (GAMA; ALVES; SCHMITT, 2008; IM et al., 2013; MATOS et al., 2005; RAKHA et al., 2007; VAN DE RIJN et al., 2002) compatível com linfoma de alto grau, que mesmo sob tratamento, resultam na morte rápida do paciente (RAKHA et al., 2008). Diferentemente de neoplasias triplo negativo, que independente da expressão de HER2 e receptores hormonais, não expressam marcadores basais e apresentam melhor prognóstico para a mulher (RAKHA et al., 2007c; VAN DE RIJN et al., 2002).

Estudos que avaliaram expressão gênica de marcadores basais em glândulas mamárias neoplásicas de mulheres, verificaram que 5% a 45% dos tumores basais podem expressar RE (RAKHA et al., 2007) e 14% HER2 (ROUZIER et al., 2005). Ou ainda, que tumores triplo negativo podem não expressar CK5 e EGFR; e tumores não triplo foram positivos para marcadores basais e RP (TAN et al., 2008). Bertuci et al. (2008) também identificou 23% de tumores basais expressando receptores hormonais e que 29% de triplo negativos não expressaram marcadores basais. Sendo assim, se definirmos os tumores triplo negativo com basais, 65% a 90% de tumores triplo negativos (KREIKE et al., 2007; NIELSEN et al., 2004;

RAKHA et al., 2007; TAN et al., 2008) e 10% a 30% de luminais (RAKHA et al., 2006; VAN DE RIJN et al., 2002) seriam considerados basais (RAKHA; ELLIS, 2009).

O prognóstico ruim e a sobrevida relatada é de 3 a 5 anos em mulheres com tumores basais como para triplo negativo (JUMPPANEN et al., 2007), contudo o triplo negativo apresenta melhor prognóstico (RAKHA et al., 2007). Em mulheres, 15% a 54% dos tumores triplo negativo expressam pelo menos um marcador basal (NIELSEN et al., 2004; ROUZIER et al., 2005) e tumores triplo negativos que não expressam marcadores basais apresentam melhor prognóstico e são mais responsivos a terapia adjuvante quanto comparados com tumores basal like (FAN et al., 2006; SOTIRIOU et al., 2003). Mesmo considerando que tumores triplo negativo que não expressam marcadores basais, tem possibilidade de apresentarem tamanhos grandes e metástases em linfonodos (FOULKES et al., 2009).

Na cadela, diversos estudos avaliaram a expressão de marcadores basais em neoplasias mamárias, demonstrando que, assim como na mulher, é preocupante as consequências da positividade ou negatividade dos marcadores basais como fator de prognóstico na cadela (GAMA; ALVES; SCHMITT, 2008; KIM et al., 2006, 2013; MATOS et al., 2005). A expressão de marcadores basais garante a heterogeneidade tumoral. Tumores positivos para receptores hormonais, raramente expressam marcadores basais, entretanto, carcinomas mamários caninos de alto grau histológico, invasivos e indiferenciados possivelmente apresentam alterações gênicas em BRCA1 e expressam pelo menos um tipo de marcador basal (MATOS et al., 2005).

Tumores mamários humanos e caninos que expressam mais de um marcador basal são propensos a apresentarem disfunção gênica em BRCA1. Este gene leva a desregulação e silenciamento da expressão de RE, além de regular positivamente genes que expressam marcadores basais como CK5, CK17 e p-caderina (FOULKES et al., 2009; IM et al., 2013; MATOS et al., 2005; SCHNEIDER et al., 2008; TAN et al., 2008; TURNER et al., 2007; TURNER; TUTT; ASHWORTH, 2004). Em reconstrução do gene BRCA1 em tumor triplo negativo humano, estes expressaram RE e apresentaram negatividade para expressão de CK5, CK17 e p-caderina (GORSKI et al., 2010; HOSEY et al., 2007).

A expressão das citoqueratinas são mais frequentes em tumores triplo negativo em cadelas, seguido de EGFR, CK14 e c-kit (KIM et al., 2006), todavia a expressão de CK5 assim como p63 e p-caderina, que são indispensáveis para identificação de tumores basais (GAMA; ALVES; SCHMITT, 2008; MATOS et al., 2005), predizem alterações em células tronco que

influenciam no fenótipo tumoral (MATOS et al., 2005). Em estudo com 241 amostras de carcinomas mamários de cadelas, 18,7% eram triplo negativos, destes, 91,1% apresentaram marcação positiva para marcadores basais e pior prognóstico quando comparado com outros subtipos moleculares (KIM et al., 2013). Abadie et al. (2018), verificaram que 58,6% de 267 tumores triplo negativos expressaram marcadores basais. Todavia, diferentemente do relatado no câncer de mama humano, a ausência de expressão de receptores basais, está ligado a menor sobrevida global e maior risco de progressão tumoral, independente do status nodal e invasividade (ABADIE et al., 2018).

A única terapia sistêmica atualmente disponível para mulheres com esses tipos de câncer é quimioterapia. Tumores triplo negativo mostram altas taxas de resposta objetiva à antraciclina juntamente com taxano, quimioterapia neoadjuvante. Pacientes com cânceres triplo negativos que não apresentam evolução terapêutica têm um significativamente pior prognóstico do que aqueles com tumores pertencentes a outros subgrupos moleculares (CAREY et al., 2007).

A conduta terapêutica para neoplasias mamárias em cadela, em ascendência, é muito discutida entre patologistas e oncologistas veterinários (CASSALI et al., 2011; PEÑA et al., 2014). A quimioterapia é utilizada como terapia adjuvante (SORENMO, 2003) e alguns protocolos são propostos como o uso da doxorubicina associado a ciclofosfamida ou da cisplastina e carboplastina (LAVALLE et al., 2012).

3. Considerações finais

A neoplasia mamária em cadelas é o segundo tipo de tumor mais frequente na espécie. Acomete cadelas adultas a idosas e não castradas. Por ser, uma patologia comum e apresentar características morfológicas e histológicas diferentes nas fêmeas, torna-se importante um estudo detalhado sobre o comportamento clínico e molecular dos diferentes tipos histológicos desta neoplasia.

No Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), a rotina de atendimento de cadelas com esta enfermidade aumentou significativamente nos últimos 10 anos e com isso, a rotina do Laboratório de Histopatologia Animal da UFU. A glândula mamária da cadela tornou-se alvo de especulações diárias e questionamentos sobre a biologia e comportamento de neoplasias semelhante em animal diferente ou ainda, de diferentes tipos histológicos de tumor de mama na mesma fêmea.

Para os tumores mamários na mulher, os estudos científicos, as pesquisas, a conduta clínica e terapêutica são bem evoluídos quando se compara a cadela. Apesar de espécies diferentes, muitos pesquisadores patologistas humanos assim como veterinários, acreditam na proximidade entre as duas espécies, em relação aos tumores mamários e este fato, tem fomentado a pesquisa das neoplasias mamárias de cadelas. Sendo assim, a busca por estudos científicos atualizados com foco na cadela somado ao desejo de pesquisa e investigação das características e comportamento dos tumores mamários caninos, foram os grandes incentivos à realização deste trabalho.

O cão ainda é o animal de companhia mais comum nos lares brasileiros. Ele é o amigo, o fiel companheiro e até o membro da família. A preocupação com o bem-estar, a saúde e a longevidade dos animais são nítidas e isso, faz com que as pessoas procurem o profissional veterinário para cuidar melhor de seu animal de estimação. Este fato, pode ser responsável pelo aumento da casuística de diversas enfermidades, dentre elas, o tumor de mama, nas clínicas e hospitais veterinários.

Todavia, atendimento médico veterinário ainda é inacessível para grande parte das pessoas. Por isso, mesmo levando o animal ao atendimento veterinário para tratamento de uma doença, o acompanhamento frequente, necessário para as neoplasias por exemplo, torna-se inviável para o tutor não só financeiramente, mas desgastante.

O acompanhamento mensal do paciente diagnosticado com qualquer tipo de neoplasia, é indispensável, visando prognóstico e a avaliação da sobrevida do animal. Este fato foi, sem dúvidas umas das maiores dificuldades enfrentadas na realização deste trabalho, o acompanhamento dos pacientes.

O acompanhamento clínico, realizado pós cirurgia de mastectomia foi determinado como um importante critério de inclusão do animal nesta pesquisa. O contato com respectivo tutor era realizado a cada 4 meses após o procedimento cirúrgico. Sendo assim, aquele animal em que se perdeu este *feedback*, infelizmente o mesmo era eliminado da pesquisa.

Acredita-se que essa redução do tamanho da amostra inicial de 150 para 84 animais influenciou negativamente os resultados esperados relacionados com a estatística e conseqüentemente, com a correlação dos tipos histológicos e a expressão dos receptores moleculares hormonais.

Apesar de vários estudos sobre este assunto, os resultados principalmente referentes aos marcadores moleculares, ainda são controversos, com valores de referências não padronizados para a espécie do estudo. Os marcadores moleculares são receptores (localizados em membrana plasmática ou nuclear) de moléculas que dentro das células são capazes de alterar funções e funcionamento da célula. Ainda controlam atividades fisiológicas celulares como transcrição e transdução gênica e produção de proteínas celulares.

O estrógeno e a progesterona são os hormônios sexuais importantes na fêmea, pois estão relacionados com ciclo estral. A fêmea canina, na puberdade, tem o primeiro contato com estes hormônios, quando o animal manifesta o primeiro cio. A glândula mamária, neste momento, também sofrerá influência destes hormônios. O estrógeno e a progesterona, em contato com receptores moleculares das células epiteliais da glândula mamária normal sofrerão processo fisiológico de proliferação celular para desenvolvimento da glândula. Todavia, estes mesmos hormônios também influenciarão no desenvolvimento e manutenção do tumor mamário, caso a fêmea possa o ter.

Na mulher, a influência dos hormônios sexuais no desenvolvimento e também no tratamento dos tumores mamários é bem estabelecida. Considerando a influência destes hormônios nos tumores mamários de cadelas, é essencial o estudo dos mesmo nesta espécie. Todavia, apesar de grande quantidade de estudos relacionando a expressão dos receptores moleculares de hormonais nas células neoplásicas mamárias de cadelas, nota-se uma discrepância dos resultados, assim como uma grande variação de percentuais de marcação positiva para estes receptores. Este fato, foi outra dificuldade enfrentada durante a confecção e defesa desta pesquisa.

A partir da expressão positiva ou negativa dos marcadores moleculares nos tumores mamários, pode-se supor muito sobre a característica e comportamento da neoplasia, assim como a sobrevida do animal. Além disso, a expressão destes receptores é o passo inicial para caracterização molecular, em que outros anticorpos são testados no tecido mamário neoplásico (HER2, Ki-67, CK, P53, caderinas) com finalidade de tratamento, determinação de sobrevida e a identificação do comportamento da neoplasia.

Apesar dos tumores mamários caninos apresentarem algumas semelhanças com os tumores de mama da mulher, há muito o que investigar sobre as neoplasias mamárias de cadelas. A cadela tem particularidades que diferem da mulher, como por exemplo, a exposição

prolongada à progesterona durante a fase diestro do ciclo estral, a localização de genes como HER2 e a estrutura molecular de alguns receptores celulares.

Além disso, para reduzir viés de pesquisas com neoplasias mamárias, outros consensus faz-se necessário, sobretudo, pesquisadores deveriam seguir o propósito dos consensus. Outra ferramenta seria a utilização de anticorpos específicos para a cadela, considerando as particularidades gênicas e moleculares dos biomarcadores da espécie.

Por fim, apesar da diversidade de estudos que utilizam a imunohistoquímica para detecção de receptores estrógeno, progesterona e HER2, os resultados, como previamente explanado, são controversos. A imunohistoquímica ainda é uma ferramenta onerosa para a espécie em estudo, contudo prática e valiosa, visando prognóstico e sobrevida do paciente. Por isso, a pesquisa e à amplificação do uso desta ferramenta nos tumores mamários caninos é indispensável, assim como, já é rotina, no câncer de mama na mulher.

Referências

- ABADIE, J. et al. Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 2: immunophenotypes and prognostic significance. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 167, n. 2, p. 459–468, 1 jan. 2018. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4542-8>
- ANDRECHEK, E. R.; WHITE, D.; MULLER, W. J. Targeted disruption of ErbB2/Neu in the mammary epithelium results in impaired ductal outgrowth. **Oncogene**, v. 24, n. 5, p. 932–937, 27 jan. 2005. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208230>
- ARAÚJO, M. R. et al. HER-2, EGFR, Cox-2 and Ki67 expression in lymph node metastasis of canine mammary carcinomas: Association with clinical-pathological parameters and overall survival. **Research in Veterinary Science**, v. 106, p. 121–130, jun. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.03.020>
- BADVE, S. et al. Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. **Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 24, n. 2, p. 157–167, fev. 2011. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.200>
- BAUER, K. R. et al. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. **Cancer**, v. 109, n. 9, p. 1721–1728, 1 maio 2007. <https://doi.org/10.1002/cncr.22618>
- BAZLEY, L. A.; GULLICK, W. J. The epidermal growth factor receptor family. **Endocrine-Related Cancer**, v. 12 Suppl 1, p. S17-27, jul. 2005. <https://doi.org/10.1677/erc.1.01032>
- BERTAGNOLLI, A. C. et al. Canine mammary mixed tumours: immunohistochemical expressions of EGFR and HER-2. **Australian Veterinary Journal**, v. 89, n. 8, p. 312–317, ago. 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2011.00803.x>
- BERTUCCI, F. et al. How basal are triple-negative breast cancers? **International Journal of Cancer**, v. 123, n. 1, p. 236–240, 1 jul. 2008. <https://doi.org/10.1002/ijc.23518>
- BOYLE, P. Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and recommendations. **Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 23 Suppl 6, p. vi7-12, ago. 2012. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds187>
- BURRAI, G. P. et al. Investigation of HER2 expression in canine mammary tumors by antibody-based, transcriptomic and mass spectrometry analysis: is the dog a suitable animal model for human breast cancer? **Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 36, n. 11, p. 9083–9091, nov. 2015. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3661-2>
- BRAGULLA, H.; KÖNIG, H.E. Glândula mamária nos animais domésticos (Mama). In: KÖNIG H.E., LIEBICH H.G. **Anatomia dos Animais Domésticos: Texto e atlas colorido**. Vol.2 – Órgãos e sistemas. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.335-343.
- CAREY, L. A. et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American**

Association for Cancer Research, v. 13, n. 8, p. 2329–2334, 15 abr. 2007.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1109>

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, 2011.

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

CASSALI, G. D. **Patologia mamária canina, do diagnóstico ao tratamento**. São Paulo: Medvet, p. 141-149, 2017.

CASSALI, G. D. et al. Consensus regarding the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors: benign mixed tumors, carcinomas in mixed tumors and carcinosarcomas. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 10, n. 3, p. 87–99, 2017.
<https://doi.org/10.24070/bjvp.1983-0246.v10i3p87-99>

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, 15 ago. 2009.
<https://doi.org/10.2460/javma.235.4.391>

CHEANG, M. C. U. et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 14, n. 5, p. 1368–1376, 1 mar. 2008. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1658>

COUCH, F. J. et al. Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 33, n. 4, p. 304–311, 1 fev. 2015.

CSERNI, G. et al. Estrogen receptor negative and progesterone receptor positive breast carcinomas-how frequent are they? **Pathology oncology research: POR**, v. 17, n. 3, p. 663–668, set. 2011. <https://doi.org/10.1007/s12253-011-9366-y>

CUI, X. et al. Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 23, n. 30, p. 7721–7735, 20 out. 2005.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2005.09.004>

DE LAS MULAS, J. M.; MILLÁN, 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, n. 2, p. 200–212, mar. 2005.
<https://doi.org/10.1354/vp.42-2-200>

DE MAEYER, L. et al. Does Estrogen Receptor–Negative/Progesterone Receptor–Positive Breast Carcinoma Exist? **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 2, p. 335–336, 10 jan. 2008.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2007.14.8411>

DENT, R. et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 13, n. 15 Pt 1, p. 4429–4434, 1 ago. 2007. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-3045>

DIAS, M. L. DE M. et al. Survival analysis of female dogs with mammary tumors after mastectomy: epidemiological, clinical and morphological aspects. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 3, p. 181–186, mar. 2016. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016000300006>

DOBSON, J. M. **Breed-Predispositions to Cancer in Pedigree Dogs**. Research article. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/isrn/2013/941275/>>. Acesso em: 25 mar. 2019. <https://doi.org/10.1155/2013/941275>

DOGAN, B. E. et al. Multimodality imaging of triple receptor-negative tumors with mammography, ultrasound, and MRI. **AJR. American journal of roentgenology**, v. 194, n. 4, p. 1160–1166, abr. 2010. <https://doi.org/10.2214/AJR.09.2355>

DOLKA, I.; KRÓL, M.; SAPIERZYŃSKI, R. Evaluation of apoptosis-associated protein (Bcl-2, Bax, cleaved caspase-3 and p53) expression in canine mammary tumors: An immunohistochemical and prognostic study. **Research in Veterinary Science**, v. 105, p. 124–133, abr. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.02.004>

DUTRA, A. P. et al. c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas**, v. 37, n. 11, p. 1673–1681, nov. 2004. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2004001100013>

EARP, H. S. et al. Heterodimerization and functional interaction between EGF receptor family members: a new signaling paradigm with implications for breast cancer research. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 35, n. 1, p. 115–132, jul. 1995. <https://doi.org/10.1007/BF00694752>

ELSTON, C.W.; ELLIS, I.O. Assessment of Histological Grade. In: **Systemic Pathology**. 3a ed. London, Churchill Livingstone, 1998, p.365-384

ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**, v. 19, n. 5, p. 403–410, nov. 1991. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x>

ERICKSON, S. L. et al. ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with ErbB2-and heregulin-deficient mice. **Development (Cambridge, England)**, v. 124, n. 24, p. 4999–5011, dez. 1997.

FAN, C. et al. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 6, p. 560–569, 10 ago. 2006. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa052933>

FERREIRA, E.; CAMPOS, M. R. A.; NAKAGAKI, K. Y. R.; CASSALI, G. D. Marcadores prognósticos e preditivos no câncer de mama. In: CASSALI, G. D. **Patologia mamária canina, do diagnóstico ao tratamento**. São Paulo: Medvet, p. 141-149, 2017.

FONSECA, C. S.; DALECK, C. R. Neoplasias mamárias em cadelas: influência hormonal e efeitos da ovario-histerectomia como terapia adjuvante. **Ciência Rural**, v. 30, n. 4, p. 731–735, ago. 2000. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782000000400030>

FOULKES, W. D. et al. Tumor size is an unreliable predictor of prognosis in basal-like breast cancers and does not correlate closely with lymph node status. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 117, n. 1, p. 199–204, set. 2009. <https://doi.org/10.1007/s10549-008-0102-6>

FRAPPIER, B. Epitélio. In: EURELL, J.A.; FRAPPIER, B. **Histologia Veterinária de Dellmann**. Barueri, Brasil: Manole, 2012, p. 25-30.

FUQUA, S. A. et al. Variant human breast tumor estrogen receptor with constitutive transcriptional activity. **Cancer Research**, v. 51, n. 1, p. 105–109, 1 jan. 1991.

GAMA, A.; ALVES, A.; SCHMITT, F. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. **Virchows Archiv: An International Journal of Pathology**, v. 453, n. 2, p. 123–132, ago. 2008. <https://doi.org/10.1007/s00428-008-0644-3>

GAMBA, C. O.; FERREIRA, E.; SALGADO, B. S.; et al. Neoplasias malignas. In: CASSALI, G. D. Patologia mamária canina, do diagnóstico ao tratamento. São Paulo: Medvet, p. 91-116, 2017. GOLDSCHMIDT, M. et al. Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 117–131, jan. 2011. <https://doi.org/10.1177/0300985810393258>

GOLDSCHMIDT, M. H.; PEÑA, L.; ZAPPULLI, V. Tumours of th mammary gland. In: **Tumors in domestic animals**. 5^a ed. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2017. p. 723–765. <https://doi.org/10.1177/0300985810393258>

GOLDSCHMIDT, M. et al. Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 117–131, jan. 2011. <https://doi.org/10.1177/0300985810393258>

GORSKI, J. J. et al. BRCA1 transcriptionally regulates genes associated with the basal-like phenotype in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 122, n. 3, p. 721–731, ago. 2010.

GORDEN, P.J.; TIMMS, L.L. Lactação. In: WILLIAN, O.R. Dukes, Fisiologia dos animais domésticos. 13^a ed. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan, 2017, p.681-683.

GUNDIM, L. F. et al. Clinical staging in bitches with mammary tumors: Influence of type and histological grade. **Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne De Recherche Veterinaire**, v. 80, n. 4, p. 318–322, out. 2016.

GUTIERREZ, C.; SCHIFF, R. HER2: biology, detection, and clinical implications. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 135, n. 1, p. 55–62, jan. 2011.

HAFFTY, B. G. et al. Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 24, n. 36, p. 5652–5657, 20 dez. 2006. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.06.5664>

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 (unabridged version). **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 134, n. 7, p. e48-72, jul. 2010.

HENDERSON, B. E.; ROSS, R. K.; PIKE, M. C. Hormonal chemoprevention of cancer in women. **Science (New York, N.Y.)**, v. 259, n. 5095, p. 633–638, 29 jan. 1993.
<https://doi.org/10.1126/science.8381558>

HERBST, R. S. Review of epidermal growth factor receptor biology. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, v. 59, n. 2 Suppl, p. 21–26, 2004.
<https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2003.11.041>

HOSEY, A. M. et al. Molecular basis for estrogen receptor alpha deficiency in BRCA1-linked breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 99, n. 22, p. 1683–1694, 21 nov. 2007.

HSU, W.-L. et al. Increased survival in dogs with malignant mammary tumours overexpressing HER-2 protein and detection of a silent single nucleotide polymorphism in the canine HER-2 gene. **Veterinary Journal (London, England: 1997)**, v. 180, n. 1, p. 116–123, abr. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.10.013>

INTERNATIONAL COMMITTEE ON VETERINARY GROSS ANATOMICAL NOMENCLATURE. **Nomina anatomica veterinaria**. 6. ed. Hanover: ICVGAN Editorial Committee, 2017. 178p.

IM, K. S. et al. Analysis of a new histological and molecular-based classification of canine mammary neoplasia. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 3, p. 549–559, maio 2014.
<https://doi.org/10.1177/0300985813498780>

IWAO, K. et al. Quantitative analysis of estrogen receptor- α and - β messenger RNA expression in breast carcinoma by real-time polymerase chain reaction. **Cancer**, v. 89, n. 8, p. 1732–1738, 2000. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(20001015\)89:8%3C1732::AID-CNCR13%3E3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1097-0142(20001015)89:8%3C1732::AID-CNCR13%3E3.0.CO;2-2)

JONES, F. E.; STERN, D. F. Expression of dominant-negative ErbB2 in the mammary gland of transgenic mice reveals a role in lobuloalveolar development and lactation. **Oncogene**, v. 18, n. 23, p. 3481–3490, 10 jun. 1999. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202698>

JUMPPANEN, M. et al. Basal-like phenotype is not associated with patient survival in estrogen-receptor-negative breast cancers. **Breast cancer research: BCR**, v. 9, n. 1, p. R16, 2007. <https://doi.org/10.1186/bcr1649>

KALLIONIEMI, O. P. et al. ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 12, p. 5321–5325, 15 jun. 1992.
<https://doi.org/10.1073/pnas.89.12.5321>

KAMIGUCHI, E.; MOREIRA. Mammary Neoplasms in Female Dogs: Identification of Cytopathological Criteria for Malignancy. **Journal of Cytology & Histology**, v. 07, n. 01, 2015. <https://doi.org/10.4172/2157-7099.1000392>

- KARAYANNOPOULOU, M. et al. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. **Journal of Comparative Pathology**, v. 133, n. 4, p. 246–252, nov. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2005.05.003>
- KAYA, H. et al. Her-2/neu gene amplification compared with HER-2/neu protein overexpression on ultrasound guided core-needle biopsy specimens of breast carcinoma. **Pathology oncology research: POR**, v. 7, n. 4, p. 279–283, 2001. <https://doi.org/10.1007/BF03032384>
- KIM, H.-W. et al. Breed- and age-related differences in canine mammary tumors. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 80, n. 2, p. 146–155, abr. 2016.
- KIM, J. H. et al. Expression of HER-2 and nuclear localization of HER-3 protein in canine mammary tumors: histopathological and immunohistochemical study. **Veterinary Journal (London, England: 1997)**, v. 189, n. 3, p. 318–322, set. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.08.012>
- KIM, N. H. et al. Identification of triple-negative and basal-like canine mammary carcinomas using four basal markers. **Journal of Comparative Pathology**, v. 148, n. 4, p. 298–306, maio 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2012.08.009>
- 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, n. 1, p. 42–50, 1 jul. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2014.04.001>
- KLEIN, B.G. Reprodução e lactação. In: KLEIN, B.G. **Cunningham Tratado de Fisiologia Veterinária**. 5ª ed. Rio de Janeiro, Brasil: Elsevier, 2014, p.440-448.
- KOJIMA, H. et al. Apoptosis of pregnancy-dependent mammary tumor and transplantable pregnancy-dependent mammary tumor in mice. **Cancer Letters**, v. 110, n. 1–2, p. 113–121, 20 dez. 1996. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(96\)04469-2](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(96)04469-2)
- KONECNY, G. et al. Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 95, n. 2, p. 142–153, 15 jan. 2003. <https://doi.org/10.1093/jnci/95.2.142>
- KREIKE, B. et al. Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. **Breast cancer research: BCR**, v. 9, n. 5, p. R65, 2007. <https://doi.org/10.1186/bcr1771>
- LAVALLE, G. E. et al. Canine malignant mammary gland neoplasms with advanced clinical staging treated with carboplatin and cyclooxygenase inhibitors. **In Vivo (Athens, Greece)**, v. 26, n. 3, p. 375–379, jun. 2012.
- LIM, H.-Y. et al. Effects of Obesity and Obesity-Related Molecules on Canine Mammary Gland Tumors. **Veterinary Pathology**, v. 52, n. 6, p. 1045–1051, nov. 2015. <https://doi.org/10.1177/0300985815579994>
- LIN, N. U. et al. Clinicopathologic features, patterns of recurrence, and survival among women with triple-negative breast cancer in the National Comprehensive Cancer Network. **Cancer**, v. 118, n. 22, p. 5463–5472, 15 nov. 2012a. <https://doi.org/10.1002/ncr.27581>

- LUIZ, C. R.; MIGLINO, M. A.; SANTOS, T. C. SEGMENTOS ANÁTOMO-CIRÚRGICOS ARTERIAIS DA GLÂNDULA MAMÁRIA EM CÃES (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758). **Archives of Veterinary Science**, v. 7, n. 1, 2002. <https://doi.org/10.5380/avs.v7i1.3965>
- MANEE-IN, S. et al. The number of ER α and PR in the mammary glands of bitches with and without tumor mass using immunohistochemical assay. **Comparative Clinical Pathology**, v. 18, n. 3, p. 221, 26 nov. 2008. <https://doi.org/10.1007/s00580-008-0786-3>
- MARTIN DE LAS MULAS, J. et al. Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 80, n. 3, p. 363–367, ago. 2003. <https://doi.org/10.1023/A:1024929730165>
- MARTINS, L.R.; LOPES, M.D. Pseudociese canina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.29, n. 3/4, p.137-141, jul./dez. 2005.
- MATOS, I. et al. p63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. **Virchows Archiv: An International Journal of Pathology**, v. 447, n. 4, p. 688–694, out. 2005. <https://doi.org/10.1007/s00428-005-0010-7>
- MCGUIRE, W. L.; CHAMNESS, G. C.; FUQUA, S. A. Estrogen receptor variants in clinical breast cancer. **Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 5, n. 11, p. 1571–1577, nov. 1991. <https://doi.org/10.1210/mend-5-11-1571>
- 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. 3, p. 225–232, dez. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.02.002>
- MISDORP, W.; ELSE, R.W.; HELLMÉN, E.; LIPSCOMB, T.P. Histological classification of mammary tumors of the dog and cat. In: **International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals**. 2^a Serie, v.7. World Health Organization, Geneva, Switzerland. p.63-64, 1999.
- MISDORP, M. Tumours of the mammary gland. In: **Tumors in Domestic Animals**. 4^a ed. Iowa States California: Blackwell Publishing Company, 2002. p. 575–606. <https://doi.org/10.1002/9780470376928.ch12>
- MISDORP, W. et al. Canine malignant mammary tumours. I. Sarcomas. **Veterinary Pathology**, v. 8, n. 2, p. 99–117, 1971. <https://doi.org/10.1177/030098587100800202>
- MISDORP, W. et al. Canine Malignant Mammary Tumours II. Adenocarcinomas, Solid Carcinomas and Spindle Cell Carcinomas. **Veterinary Pathology**, v. 9, n. 6, p. 447–470, nov. 1972. <https://doi.org/10.1177/030098587200900605>
- MISDORP, W. et al. Canine malignant mammary tumors. 3. Special types of carcinomas, malignant mixed tumors. **Veterinary Pathology**, v. 10, n. 3, p. 241–256, 1973. <https://doi.org/10.1177/030098587301000307>
- MOELANS, C. B. et al. Current technologies for HER2 testing in breast cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 80, n. 3, p. 380–392, dez. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2010.12.005>

MUHAMMADNEJAD, A. et al. Overexpression of her-2/neu in malignant mammary tumors; translation of clinicopathological features from dog to human. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 13, n. 12, p. 6415–6421, 2012. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2012.13.12.6415>

MULDOON, T. G. Interplay between estradiol and prolactin in the regulation of steroid hormone receptor levels, nature, and functionality in normal mouse mammary tissue. **Endocrinology**, v. 109, n. 5, p. 1339–1346, nov. 1981. <https://doi.org/10.1210/endo-109-5-1339>

MURUA ESCOBAR, H. et al. The canine ERBB2 gene maps to a chromosome region frequently affected by aberrations in tumors of the dog (*Canis familiaris*). **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 94, n. 3–4, p. 194–195, 2001. <https://doi.org/10.1159/000048815>

NADJI, M. et al. Immunohistochemistry of estrogen and progesterone receptors reconsidered: experience with 5,993 breast cancers. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 123, n. 1, p. 21–27, jan. 2005. <https://doi.org/10.1309/4WV79N2GHJ3X1841>

NEWMAN, L. A. et al. The 2014 Society of Surgical Oncology Susan G. Komen for the Cure Symposium: triple-negative breast cancer. **Annals of Surgical Oncology**, v. 22, n. 3, p. 874–882, mar. 2015. <https://doi.org/10.1245/s10434-014-4279-0>

NIELSEN, T. O. et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 10, n. 16, p. 5367–5374, 15 ago. 2004. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0220>

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>

OLIVEIRA FILHO, J. C. et al. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 177–185, fev. 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2010000200014>

OSBORNE, C. K. et al. Endocrine responsiveness: understanding how progesterone receptor can be used to select endocrine therapy. **Breast (Edinburgh, Scotland)**, v. 14, n. 6, p. 458–465, dez. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2005.08.024>

PALMA, G. et al. Triple negative breast cancer: looking for the missing link between biology and treatments. **Oncotarget**, v. 6, n. 29, p. 26560–26574, 29 set. 2015. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5306>

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

PEÑA, L. et al. Canine mammary tumors: a review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 1, p. 127–145, jan. 2014. <https://doi.org/10.1177/0300985813509388>

- PEREIRA, C. T. et al. Lymphatic drainage on healthy and neoplastic mammary glands in female dogs: can it really be altered? **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 32, n. 5, p. 282–290, out. 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0264.2003.00485.x>
- PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747–752, 17 ago. 2000. <https://doi.org/10.1038/35021093>
- RAKHA, E. A. et al. Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation. **The Journal of Pathology**, v. 208, n. 4, p. 495–506, mar. 2006. <https://doi.org/10.1002/path.1916>
- RAKHA, E. A. et al. Biologic and clinical characteristics of breast cancer with single hormone receptor positive phenotype. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 25, n. 30, p. 4772–4778, 20 out. 2007. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.12.2747>
- RAKHA, E. A.; ELLIS, I. O. Triple-negative/basal-like breast cancer: review. **Pathology**, v. 41, n. 1, p. 40–47, 1 jan. 2009. <https://doi.org/10.1080/00313020802563510>
- RAKHA, E. A.; REIS-FILHO, J. S.; ELLIS, I. O. Basal-like breast cancer: a critical review. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 26, n. 15, p. 2568–2581, 20 maio 2008. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.13.1748>
- 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, 2017. <https://doi.org/10.1177/0300985817698208>
- REIS-FILHO, J. S.; TUTT, A. N. J. Triple negative tumours: a critical review. **Histopathology**, v. 52, n. 1, p. 108–118, jan. 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2007.02889.x>
- REESE, S.; BUDRAS, K.-D.; MÜLLING, Chr.; BRAGULLA, H.; KÖNIG, H.E. Tegumento Comum. In: KÖNIG, H.E.; LIEBICH, H-G. **Anatomia dos animais domésticos – Texto e atlas colorido**. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2016, p. 615-630.
- RESSEL, L. et al. HER-2 expression in canine morphologically normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissues and its correlation with the clinical outcome. **Research in Veterinary Science**, v. 94, n. 2, p. 299–305, abr. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.09.016>
- RIBAS, C. R. et al. Alterações Clínicas, Epidemiológicas, Citológicas, Histológicas e Estadiamento de Cães com Neoplasias Mamárias. **Archives of Veterinary Science**, v. 17, n. 1, 2 jul. 2012. <https://doi.org/10.5380/avs.v17i1.24107>
- ROSS, J. S.; FLETCHER, J. A. The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. **Stem Cells (Dayton, Ohio)**, v. 16, n. 6, p. 413–428, 1998. <https://doi.org/10.1002/stem.160413>

ROUZIER, R. et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 11, n. 16, p. 5678–5685, 15 ago. 2005.

<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2421>

RUNGSIPAT, A. et al. Immunohistochemical analysis of c-yes and c-erbB-2 oncogene products and p53 tumor suppressor protein in canine mammary tumors. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 61, n. 1, p. 27–32, jan. 1999.

<https://doi.org/10.1292/jvms.61.27>

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

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

SASSI, F. et al. Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. **BMC Veterinary Research**, v. 6, p. 5, 28 jan. 2010.

<https://doi.org/10.1186/1746-6148-6-5>

SCHNEIDER, B. P. et al. Triple-negative breast cancer: risk factors to potential targets. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 14, n. 24, p. 8010–8018, 15 dez. 2008.

SCHNEIDER, R.; DORN, C. R.; TAYLOR, D. O. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 43, n. 6, p. 1249–1261, dez. 1969.

SEOL, H. et al. Intratumoral heterogeneity of HER2 gene amplification in breast cancer: its clinicopathological significance. **Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 25, n. 7, p. 938–948, jul. 2012.

<https://doi.org/10.1038/modpathol.2012.36>

SHAO, W.; BROWN, M. Advances in estrogen receptor biology: prospects for improvements in targeted breast cancer therapy. **Breast Cancer Research**, v. 6, n. 1, p. 39–52, 2004.

<https://doi.org/10.1186/bcr742>

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

<https://doi.org/10.1590/S0103-84782004000200048>

SINGER, J. et al. Comparative oncology: ErbB-1 and ErbB-2 homologues in canine cancer are susceptible to cetuximab and trastuzumab targeting. **Molecular Immunology**, v. 50, n. 4, p. 200–209, abr. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.01.002>

SLAMON, D. J. et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. **Science (New York, N.Y.)**, v. 235, n. 4785, p. 177–182, 9 jan. 1987. <https://doi.org/10.1126/science.3798106>

SLAMON, D. J. et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. **Science (New York, N.Y.)**, v. 244, n. 4905, p. 707–712, 12 maio 1989.

<https://doi.org/10.1126/science.2470152>

SLEECKX, N. et al. Canine mammary tumours, an overview. **Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene**, v. 46, n. 6, p. 1112–1131, dez. 2011.

<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01816.x>

SOARES, N. P. et al. Prognostic Factors in Canine Mammary Carcinomas and HER2 Expression Relationship. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 45, n. 1, p. 9, 9 jun. 2017.

<https://doi.org/10.22456/1679-9216.79791>

SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 33, n. 3, p. 573–596, 1 maio 2003.

[https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(03\)00020-2](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(03)00020-2)

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>

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

<https://doi.org/10.1177/0300985810389480>

SORENMO, K.U.; WORLEY, D.R.; GOLDSCHMIDT, M.H. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN'S, E.G. **Small animal clinical oncology**, 5^aed. Elsevier Saunders: St. Louis, Missouri, p.538-556, 2013.

<https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-2362-5.00027-X>

SØRLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 19, p. 10869–10874, 11 set. 2001.

<https://doi.org/10.1073/pnas.191367098>

SOTIRIOU, C. et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 18, p. 10393–10398, 2 set. 2003.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1732912100>

TAN, D. S. P. et al. Triple negative breast cancer: molecular profiling and prognostic impact in adjuvant anthracycline-treated patients. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 111, n. 1, p. 27–44, set. 2008.

<https://doi.org/10.1007/s10549-007-9756-8>

TYLER, J. Exame clínico das glândulas mamárias. In: RADOSTITS, O.M.; MAYHEW, I.G.J.; HOUSTON, D.M. **Exame clínico e diagnóstico em veterinária**. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan, 2002, p. 572-578.

THAKKAR, J. P.; MEHTA, D. G. A review of an unfavorable subset of breast cancer: estrogen receptor positive progesterone receptor negative. **The Oncologist**, v. 16, n. 3, p. 276–285, 2011.

<https://doi.org/10.1634/theoncologist.2010-0302>

TORÍBIO, J. M. DE M. L. et al. Caracterização clínica, diagnóstico histopatológico e distribuição geográfica das neoplasias mamárias em cadelas de Salvador, Bahia. **Revista Ceres**, p. 427–433, 1 dez. 2012. <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2012000400001>

TURNER, N. C. et al. BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. **Oncogene**, v. 26, n. 14, p. 2126–2132, 29 mar. 2007. <https://doi.org/10.1038/nrc1457>

TURNER, N.; TUTT, A.; ASHWORTH, A. Hallmarks of “BRCAness” in sporadic cancers. **Nature Reviews. Cancer**, v. 4, n. 10, p. 814–819, 2004. <https://doi.org/10.1038/nrc1457>

VANCE, G. H. et al. Genetic heterogeneity in HER2 testing in breast cancer: panel summary and guidelines. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 133, n. 4, p. 611–612, abr. 2009.

VAN DE RIJN, M. et al. Expression of Cytokeratins 17 and 5 Identifies a Group of Breast Carcinomas with Poor Clinical Outcome. **The American Journal of Pathology**, v. 161, n. 6, p. 1991–1996, dez. 2002. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64476-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64476-8)

VARALLO, G. R. [UNESP. Classificação fenotípica prognóstica para neoplasmas mamários em cadelas. 16 nov. 2016.

VLAHOVIC, G.; CRAWFORD, J. Activation of tyrosine kinases in cancer. **The Oncologist**, v. 8, n. 6, p. 531–538, 2003. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.8-6-531>

WALKER, R. A. Immunohistochemical markers as predictive tools for breast cancer. **Journal of Clinical Pathology**, v. 61, n. 6, p. 689–696, jun. 2008. <https://doi.org/10.1136/jcp.2006.041830>

WIEDUWILT, M. J.; MOASSER, M. M. The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 65, n. 10, p. 1566–1584, maio 2008. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7440-8>

WOLFF, A. C. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 131, n. 1, p. 18–43, 2007.

WOLFF, A. C. et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 36, n. 20, p. 2105–2122, 10 jul. 2018.

YAMASHITA, H. et al. Immunohistochemical evaluation of hormone receptor status for predicting response to endocrine therapy in metastatic breast cancer. **Breast Cancer (Tokyo, Japan)**, v. 13, n. 1, p. 74–83, 2006. <https://doi.org/10.2325/jbcs.13.74>

YANG, X. R. et al. Differences in risk factors for breast cancer molecular subtypes in a population-based study. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 16, n. 3, p. 439–443, mar. 2007. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0806>

ZUCCARI, D. A. P. C. et al. Avaliação imuno-histoquímica do gene p53 nas neoplasias mamárias caninas. **Ars Veterinaria**, v. 21, n. 3, p. 344–350, 14 maio 2008.

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

CAPÍTULO 2 - Sobrevida de cadelas com carcinoma mamário: influência de variáveis clinicopatológicas e expressão de receptores de estrógeno (ER α)

Artigo a ser submetido na Revista Semina (E-ISSN 1679-0359)

1 Sobrevida de cadelas com carcinoma mamário: influência de variáveis clinicopatológicas e
2 expressão de receptores de estrógeno (ER α)

3 Survival of bitches with mammary carcinoma: influence of clinicopathological variables and
4 estrogen expression (ER α)

5
6 Resumo:

7 A glândula mamária é frequentemente acometida por neoplasias, sendo que os tumores mamários
8 representam 50 a 70% das neoplasias diagnosticadas em cadelas adultas ou idosas e intactas. A
9 influência hormonal tem papel importante na carcinogênese de neoplasias mamárias em cadelas. Em
10 cadelas, a expressão de receptores de estrógeno (RE) também é considerada fator prognóstico.
11 Objetivou-se verificar a expressão de RE α em carcinomas mamários e correlacioná-la com
12 características clinicopatológicas, sobrevida global, intervalo livre de doença e tempo de
13 desenvolvimento de tumor em mama remanescente em cadelas. Foram incluídas neste estudo 84 cadelas.
14 Elas foram submetidas a exame radiográfico e de ultrassonografia, para avaliação de metástases
15 pulmonares e a distância, e que realizaram exérese cirúrgica como tratamento para o tumor de mama
16 (mastectomia unilateral total ou bilateral total). As amostras de neoplasias mamárias foram avaliadas
17 quanto ao tipo histológico e quanto a expressão de RE α por meio de imunohistoquímica. Realizou-se a
18 avaliação do tempo de sobrevida global (SG), do intervalo livre de doença (ILD) e o tempo de
19 desenvolvimento de tumor em mama remanescente (TDTMR). A ST foi definida como o tempo pós
20 mastectomia até a data da morte; o ILD foi o tempo pós mastectomia até o desenvolvimento de recidiva
21 ou metástase, e o TDTMR foi determinado como o tempo pós mastectomia até o surgimento de tumor
22 em glândula mamária remanescente. A média de idade das cadelas também influenciou a SG sendo que
23 cadelas mais velhas apresentaram menor tempo de sobrevida ($p=0,02$). Carcinomas com menor grau
24 histológico expressaram RE α com maior frequência ($p=0,042$). A avaliação isolada deste marcador
25 molecular não é considerada um bom fator de prognóstico quando se considera sobrevida global, tempo
26 livre de doença e o tempo de desenvolvimento de tumor em mama remanescente.

27
28 Palavras chave: cão, fator de risco, hormônios sexuais, mama, neoplasia.

29
30 Abstract:

31 The mammary gland is generally affected by neoplasms, and the 50 to 70% of canine mammary tumours,
32 diagnosed in adult or intact female dogs, are malignancies. The hormonal influence plays an important
33 role in the carcinogenesis of mammary neoplasms in bitches. In bitches, the expression of estrogen
34 receptors (ER) is also considered a prognostic factor. The objective of this study was to verify the
35 expression of RE α in mammary carcinomas and to correlate it with clinicopathological characteristics,
36 overall survival, disease-free interval and time of tumor development in remaining mammary gland in
37 bitches. 84 bitches were included in this study. The radiographic and ultrasound examination were

1 performed in order to verify metastases in lung and distal metastases (nodal). The surgical excision was
2 the treatment for the mammary tumor (total or bilateral unilateral mastectomy). Samples of mammary
3 neoplasms were evaluated for histological type and the expression of RE α by means of
4 immunohistochemistry. Evaluation of overall survival (OS), disease-free survival (DFS) and time to
5 tumor development in remaining breast (TDTMR) was performed. ST was defined as time after
6 mastectomy up to the date of death; the DFS was the time after mastectomy until the development of
7 recurrence or metastasis, and the TDTMR was determined as the time after mastectomy until the
8 appearance of tumor in the remaining mammary gland. The mean age of bitches also influenced OS,
9 with older dogs showing a shorter survival time ($p = 0.02$). Carcinomas with lower-grade histological
10 tumors expressed RE α with higher frequency ($p = 0.042$). The isolated evaluation of this molecular
11 marker is not considered a good prognostic factor when correlated to overall survival, disease-free
12 survival and tumor development time in the remaining mammary gland.

13

14 Key words: dog, mammary gland, neoplasm, risk factor, sex hormones.

15

16 Introdução

17 A glândula mamária é frequentemente acometida por neoplasias, sendo que os tumores
18 mamários representam 50 a 70% das neoplasias diagnosticadas em cadelas adultas ou idosas e intactas
19 (GODSCHMIDT et al., 2017; SORENMO et al., 2011). A influência hormonal (estrógeno e
20 progesterona) tem papel importante na carcinogênese de neoplasias mamárias em cadelas (SORENMO
21 et al., 2011; TOLEDO et al., 2016) e seu efeito pode ser comprovado pelo fato de que a esterilização
22 antes da puberdade reduz em mais de 95% o risco de cadelas desenvolverem tumores de mama
23 (BEAUVAIS; CARDWELL; BRODBELT, 2012).

24 A expressão de receptores de estrógeno (RE) e progesterona (RP) em tumores de mama é
25 considerada fator de prognóstico e prediz uma resposta terapêutica hormonal no câncer de mama
26 humano (NADJI et al., 2005; PEÑA et al., 2014). Em cadelas a expressão de RE também é considerada
27 fator prognóstico. Mamas normais, hiperplásicas e carcinomas bem diferenciados apresentam maior
28 expressão (MAINENTI et al., 2014; MILLANTA et al., 2005) e em neoplasias pouco diferenciadas ou
29 anaplásicas a expressão diminui (CHANG et al., 2009; PEÑA et al., 2014). Assim, cadelas portadoras
30 de carcinomas mamários com menor expressão de RE apresentam prognóstico desfavorável (CHANG
31 et al., 2009; NIETO et al., 2000; PETROV et al., 2016).

32 Embora recentemente tenham sido desenvolvidos estudos avaliando expressão genética de
33 receptores de estrógeno, progesterona e HER2, por meio de PCR quantitativo (KABIR et al., 2017), este
34 tipo de análise é de difícil acesso na rotina clínico veterinária pelo alto custo e necessidade de
35 infraestrutura especializada, sendo realidade somente em medicina humana. Assim, fatores como
36 viabilidade, economia, reprodutibilidade e capacidade de execução sem alta sofisticação e equipamento

1 técnico devem determinar a introdução de novos fatores prognósticos na rotina clínica (DE LAS
2 MULAS; MILLÁN; DIOS, 2005).

3 São escassos os estudos avaliando a relação entre expressão de RE e sobrevida em cadelas e os
4 resultados são controversos, assim o papel do estrógeno como fator de prognóstico em cadelas ainda
5 não foi esclarecido. Nieto et al. (2000) verificaram que a expressão de RE, índice Ki-67 e a idade foram
6 fatores independentes que poderiam predizer a sobrevida livre de doença. Enquanto que o status do
7 linfonodo, a idade e a expressão de RE foram fatores prognósticos independentes para a sobrevida
8 global. Por outro lado, Millanta et al. (2005) relataram que tanto em cães como em gatos a expressão de
9 RE e RP em carcinomas invasivos não se correlacionou com os parâmetros histológicos ou com o tempo
10 de sobrevida global.

11 Assim, com intuito de verificar o papel prognóstico da expressão de RE em carcinomas
12 mamários de cadelas, os objetivos deste trabalho foram: verificar a expressão de RE α em carcinomas
13 mamários e correlacioná-la com características clinicopatológicas, sobrevida global, intervalo livre de
14 doença e tempo de desenvolvimento de tumor em mama remanescente em cadelas.

15

16 Material e métodos

17 Foram incluídas neste estudo 84 cadelas, diagnosticadas com carcinoma mamário no Hospital
18 Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Minas Gerais, Brasil. Este estudo foi
19 aprovado pelo Comitê de Ética de Utilização Animal da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA-
20 UFU - protocolo nº127/15).

21 Os critérios de inclusão foram: cadelas intactas ou castradas com tumor de mama, submetidas a
22 exame clínico, radiográfico e ultrassonografia, para avaliação de metástases pulmonares e a distância, e
23 que realizaram exérese cirúrgica como tratamento para o tumor de mama (mastectomia unilateral total
24 ou bilateral total). Foram excluídas do estudo cadelas com histórico de uso de fármacos que pudessem
25 interferir com o desenvolvimento tumoral (drogas anti neoplásicas, anti-inflamatórios) e que foram
26 submetidas à nodulectomia.

27 Ao exame físico da glândula mamária, o tamanho do tumor foi aferido com auxílio de um
28 paquímetro e posteriormente classificado em T1 (<3cm), T2 (3 a 5cm) e T3 (>5cm) (OWEN, 1980).

29 Após a exérese cirúrgica, amostras das neoplasias mamárias e dos linfonodos regionais (axilares
30 ou inguinais) foram coletadas e acondicionadas em frascos com formol 10% tamponado. As amostras
31 foram fixadas por 48 horas e submetidas a processamento histológico para confecção de lâminas coradas
32 em hematoxilina e eosina.

33 A avaliação histológica foi realizada por dois patologistas e as neoplasias mamárias foram
34 classificadas de acordo com os tipos histológicos (GODSCHMIDT et al., 2017) e graduação histológica
35 (ELSTON; ELLIS, 1991). Considerando a proposta analítica deste estudo, quando a cadela possuía mais
36 de um nódulo neoplásico maligno, com tipos histológicos diferentes, considerou-se o tipo histológico

1 mais agressivo (RASOTTO et al., 2017). Os linfonodos também foram avaliados microscopicamente e
2 o estágio clínico das cadelas foi estabelecido utilizando-se sistema TNM (SONREMO et al., 2013)

3 As amostras de neoplasias mamárias foram avaliadas quanto à expressão de RE por meio de
4 imunohistoquímica (CINTRA, 2015). A recuperação antigênica por calor foi realizada em panela de
5 pressão por 20 minutos em tampão citrato pH 6. Para o bloqueio de peroxidase endógena utilizou-se
6 água oxigenada e metanol 3% por 20 minutos. O anticorpo anti ER α policlonal (H-184, SantaCruz[®]) foi
7 diluído 1:200 em soro albumina bovina (Amresco[®], 0332) (BSA) 1%. Os cortes receberam 100 μ l do
8 anticorpo e foram incubados por 18 h, 4°C em câmara úmida. Como sistema de revelação utilizou-se
9 anticorpo secundário biotilado e estreptavidina peroxidase (kit K069011 LSAB-Dako[®]). As lâminas
10 foram lavadas com solução com PBS 1x, entre cada etapa. A reação foi revelada com cromógeno 3,3'-
11 diaminobenzidina (DAB K3468- Dako[®]) e as lâminas contracoradas com hematoxilina de Harris,
12 desidratadas e montadas.

13 Secções de útero de cão fixadas em formol e embebidas em parafina foram utilizadas como
14 controle positivo e anticorpo primário foi substituído por diluente do anticorpo como controle negativo
15 em todos os ensaios.

16 A expressão de RE α foi determinada por análise semi quantitativa de acordo com a frequência
17 (número de células marcadas em 10 campos em objetiva de 40x). Foram consideradas positivas amostras
18 com células epiteliais apresentando marcação nuclear em mais de 10% das células e negativas quando
19 menos de 10% das células apresentaram marcação (GAMA; ALVES; SCHMITT, 2008).

20 Para determinação da sobrevida, as cadelas foram avaliadas quadrimestralmente até a data do
21 óbito ou por um período mínimo de dois anos. Dados sobre o estado geral do paciente, ocorrência ou
22 não de recidivas, surgimento de novos tumores em glândulas mamárias remanescentes ou ocorrência de
23 metástases foram registrados. Foram necropsiadas aquelas que vieram a óbito no decorrer do estudo e
24 foram voluntariamente encaminhadas pelos tutores ao Setor de Patologia Animal - UFU.

25 Realizou-se a avaliação do tempo de sobrevida global (SG), do intervalo livre de doença (ILD)
26 e o tempo de desenvolvimento de tumor em mama remanescente (TDTMR). A ST foi definida como o
27 tempo pós mastectomia até a data da morte; o ILD foi o tempo pós mastectomia até o desenvolvimento
28 de recidiva ou metástase, e o TDTMR foi determinado como o tempo pós mastectomia até o surgimento
29 de tumor em glândula mamária remanescente.

30 A análise estatística foi realizada através do programa BioEstat 5.0 (Ayres et al., 2007). O teste
31 qui-quadrado e o teste exato de Fisher foram utilizados, conforme o caso, para comparar as variáveis
32 clinicopatológicas apresentadas nos grupos positivos e negativos para estrógeno.

33 O teste de Mann-Whitney foi empregado para verificar correlação entre a imunexpressão de
34 estrógeno e o subtipo histológico dos carcinomas. A curva de sobrevida das cadelas que vieram a óbito
35 no período do estudo foi estimada através do método de Kaplan Meier e o teste Log-Rank foi utilizado
36 para comparar o tempo de sobrevida global (SG), intervalo livre de doença (ILD) e tempo de

1 desenvolvimento de tumor em mama remanescente (TDTMR) com a expressão imunohistoquímica de
2 estrógeno.

3 Na análise da ST foram censuradas cadelas que ainda estavam vivas ou que tiveram a causa do
4 óbito não relacionada à neoplasia mamária ou indeterminada; para o ILD censurou-se cadelas que não
5 tiveram recidivas ou metástase, e na avaliação do TDTMR foram censuradas cadelas submetidas à
6 mastectomia total e os casos em que foi realizada mastectomia parcial sem ocorrência de tumor em
7 glândula mamária remanescente até o final do estudo.

8 A comparação das variáveis preditoras para os TMC (idade, tamanho do tumor, TNM, tipo
9 histológico, grau histológico e expressão de estrógeno) com o tempo o tempo de ST foi realizada por
10 meio de análise multivariada por regressão de Cox. Em todos os testes foi adotado o nível de
11 significância de 5% ($p < 0,05$).

12

13

14 Resultados e Discussão

15 A idade média das cadelas desse estudo foi de $10,14 \pm 2,82$ anos, sendo a maioria das cadelas
16 com idade igual ou superior a oito anos (71/84 – 84,53%). Cadelas sem raça definida (SRD) (41/84 –
17 48,81%) apresentaram tumor de mama com maior frequência, seguidas de cadelas da raça Poodle (14/84
18 – 16,67%) (Tabela 1).

19 Os TMC são frequentemente diagnosticados em cadelas adultas e idosas (TORÍBIO et al.,
20 2012) e a idade está diretamente relacionada a um pior prognóstico (DIAS et al., 2016; RASOTTO et
21 al., 2017). No presente estudo, a média de idade das cadelas também influenciou a SG sendo que cadelas
22 mais velhas apresentaram menor tempo de sobrevida ($p = 0,02$). A idade é importante fator de prognóstico
23 clínico (DOLKA; KRÓL; SAPIERZYŃSKI, 2016), pois a cada ano adicional para a cadela aumenta a
24 taxa de risco de desenvolvimento de tumor de mama em 23% (DIAS et al., 2016).

25 Neoplasias menores que três centímetros (T1) foram mais frequentes (34/84 – 40,47%). O
26 tamanho tumoral é considerado um fator de prognóstico importante para cadelas (CASSALI et al., 2014;
27 SORENMO et al., 2011) além de ter relação com a sobrevida (DIAS et al., 2016). Porém no presente
28 estudo, na análise multivariada de Cox, o tamanho das neoplasias mamárias não apresentou relação com
29 a sobrevida ($p = 0,616$) (Tabela 2).

30 Dias et al. (2016) e Philibert et al. (2003) correlacionaram tamanho de tumor e a sobrevida
31 também utilizando a análise multivariada e verificaram que cadelas com tumores menores apresentam
32 maior tempo de sobrevida em relação aquelas com tumores maiores que 3cm de diâmetro. O modelo de
33 riscos proporcionais de Cox é uma análise de regressão múltipla aplicado na análise de sobrevida e
34 indicado quando se deseja estimar o papel de variáveis independentes que agem multiplicativamente
35 sobre o risco (KLEINBAUM e KLEIN, 1995). Assim, diversos fatores além do tamanho, como o tipo e
36 grau histológico, podem influenciar em conjunto a sobrevida de cadelas com neoplasia mamária.

1 Além do tamanho tumoral, o estadiamento do paciente também deve ser avaliado como fator
2 prognóstico em TMC (LAVALLE et al., 2009). No presente estudo, 30,97% das cadelas receberam
3 estadiamento IV e o estadiamento clínico não apresentou correlação com sobrevida ($p=0,265$), porém o
4 pequeno número de cadelas com metástase à distância neste estudo pode ter influenciado na análise
5 estatística.

6 A distribuição de cadelas com TM entre os diversos estádios (TNM) varia entre diversos
7 estudos. Toríbio et al. (2012) relataram 27,7% de cadelas em estágio I e II, e 19,60% em IV; Gundim
8 et al. (2016) 31,75% em estágio I e 22,22% em IV. Já Oliveira Filho et al. (2010) e Lavalle et al. (2012)
9 observaram respectivamente, 29,5% e 82,7% das cadelas com estágio IV.

10 O tipo histológico mais frequente foi o carcinoma complexo (38/84 – 45,24%), tendo maior
11 frequência tumores grau II (37/84 – 44,04%) (Tabela 1). Contudo o tipo histológico ($p=0,32$) e grau
12 ($p=0,56$) não influenciaram a sobrevida. O carcinoma complexo tem sido relatado como o tipo mais
13 frequente, com melhor sobrevida e menor risco de morte pela neoplasia (RASOTTO et al., 2017;
14 SANTOS et al., 2013). Por outro lado, cães com carcinomas simples apresentam pior prognóstico
15 quando comparados com outros carcinomas (KARAYANNOPOULOU et al., 2005).

16 Outros estudos também relataram neoplasias mamárias de grau II como sendo as mais
17 frequentes (DIAS et al., 2016; KARAYANNOPOULOU et al., 2005), sendo que não houve diferença
18 na sobrevida quando comparados carcinomas de grau II ou III, com ambos os graus apresentando pior
19 prognóstico (KARAYANNOPOULOU et al., 2005).

20 A imunomarcção positiva de receptores de estrogênio ($RE\alpha$) foi identificada em núcleos de
21 células epiteliais neoplásicas, enquanto estroma, células mioepiteliais, cartilaginosas e ósseas, em
22 tumores complexos e mistos, não apresentaram reatividade para $RE\alpha$, confirmando a reatividade do
23 anticorpo utilizado e manutenção da antigenicidade dos tecidos testados (Figura 1).

24 Em 30,95% (26/84) das amostras de neoplasias mamárias houve expressão de $RE\alpha$, enquanto
25 59,05% (58/84) dos casos foram negativos. Estudos avaliando a imunoexpressão de $RE\alpha$ como fator
26 prognóstico e preditivo em TMC ainda são incomuns, com resultados variáveis e inconclusivos
27 apresentando percentuais de marcação positiva para $RE\alpha$ que variam de 10% a 92,3% (PEÑA et al.,
28 2014).

29 A variação de percentual de marcação positiva para RE nos tumores mamários caninos pode ter
30 como origem a utilização de diferentes clones de anticorpos, em que a sensibilidade e a especificidade
31 são variáveis. O uso de anticorpos específicos para a cadela, assim como a padronização de métodos de
32 detecção antigênica podem reduzir estas discrepâncias (PEÑA et al., 2014). Ainda, conforme as
33 recomendações da ASCO (2010), para imunohistoquímica de RE e PR em humanos, todos os tumores
34 $RE\alpha$ falsos negativos apresentam três características investigáveis: fixação inadequada, ausência de
35 controles negativo e interno da reação (HAMMOND et al., 2010). Por fim, a qualidade do corte
36 histológico, o treinamento do patologista na leitura das lâminas e a falta de padronização na interpretação

1 das imunorreatividades dos marcadores moleculares para as neoplasias mamárias de cadela (PEÑA et
2 al., 2014) podem interferir nos resultados de marcação para marcadores moleculares.

3 Não houve correlação entre a expressão de RE α nos carcinomas e a idade do animal, assim como
4 relatado por outros autores (CHANG et al., 2009; DE LAS MULAS; MILLÁN; DIOS, 2005;
5 MILLANTA et al., 2005, 2014). Considerando que os TMC acometem principalmente cadelas idosas,
6 acredita-se que a expressão de RE α decresça de acordo com a idade (CHANG et al., 2009; NIETO et
7 al., 2000).

8 Vários autores relataram que neoplasias malignas com subtipos mais indiferenciados expressam
9 menos RE α (CHANG et al., 2009; DE LAS MULAS; MILLÁN; DIOS, 2005; MILLANTA et al., 2005;
10 YANG et al., 2006). Não houve correlação da expressão de RE α com os subtipos histológicos, porém
11 carcinomas com menor grau histológico expressaram RE α com maior frequência ($p=0,042$) (Tabela 3).

12 O percentual de expressão positiva de RE α deste estudo (30,95%) é considerado baixo quando
13 se compara a expressão de RE α em mulheres (68,8% a 81%) (HAMMOND et al., 2010; YAMASHITA
14 et al., 2006). Contudo, baixa expressão de RE α em TMC já foi relatada em estudos prévios, com
15 percentuais variando de 6,30% (ILLERA et al., 2006) a 22% (DE LAS MULAS; MILLÁN; DIOS,
16 2005), sendo esta baixa expressão associada a indiferenciação histológica (CHANG et al., 2009; DE
17 LAS MULAS; MILLÁN; DIOS, 2005). Ademais, a não expressão de RE α pode estar relacionada à
18 detecção limitada do anticorpo, ou ainda, a ligação incompleta do estrógeno ao seu receptor RE α
19 (FUQUA et al., 1991; MCGUIRE; CHAMNESS; FUQUA, 1991).

20 No presente estudo carcinomas com menor grau histológico expressaram RE α com maior
21 frequência. Vários estudos indicaram que os carcinomas complexos com grau histológico I ou II
22 expressaram com maior frequência RE α quando comparados com carcinomas simples (tubular e
23 tubulopapilar) em qualquer grau histológico (CHANG et al., 2009; DE LAS MULAS; MILLÁN; DIOS,
24 2005; MILLANTA et al., 2014; MORRIS et al., 2009). Menor expressão de RE α foi observada quando
25 havia associação de subtipos histológicos malignos com alto grau histológico e que esta associação
26 resultava em prognóstico ruim tanto na cadela como na mulher (DE LAS MULAS; MILLÁN; DIOS,
27 2005; NIETO et al., 2000; YAMASHITA et al., 2006).

28 Os carcinomas complexos grau II foram a maioria neste estudo. Carcinomas indiferenciados, de
29 grau histológico II ou III apresentam risco de metástase nodal e a distância, além de não expressarem
30 RE α , principalmente devido à indiferenciação celular (CHANG et al., 2009; DE LAS MULAS;
31 MILLÁN; DIOS, 2005; PEÑA et al., 2014)

32 Também não foi observada correlação do estadiamento clínico com a imunomarcação para RE α
33 ($p=0,522$) (Tabela 3). A expressão RE α , em especial na mulher, associado ao estadiamento clínico são
34 considerados importantes fatores de prognóstico (HAMMOND et al., 2010; YAMASHITA et al., 2006),
35 e parece ter o mesmo papel nos TMC (CHANG et al., 2009; DE LAS MULAS; MILLÁN; DIOS, 2005).
36 Estudos em TMC, com análises univariadas, verificaram expressão de RE α para cadelas em
37 estadiamento clínico I, II e III (CHANG et al., 2009; DE LAS MULAS; MILLÁN; DIOS, 2005). Estes

1 autores ao avaliarem individualmente, a presença de metástase tanto a distância como em linfonodos,
2 também verificaram que há correlação com expressão de RE α (CHANG et al., 2009; DE LAS MULAS;
3 MILLÁN; DIOS, 2005). No entanto, a análise univariada, quando comparada à multivariada, não é
4 indicada para analisar fatores de prognóstico relacionados entre si (DE LAS MULAS; MILLÁN; DIOS,
5 2005).

6 Recidiva local ocorreu em 3,57% (3/84) das cadelas e metástase à distância foi observada em
7 40,47% (34/84). Todas as cadelas (3/84) que tiveram recidiva local também apresentaram
8 desenvolvimento posterior de metástase à distância. O ILD foi de 234,45 \pm 241,05 dias (7,8 \pm 8,03
9 meses).

10 Mastectomia total bilateral foi realizada em 26,19% (22/84) das cadelas e a mastectomia total
11 unilateral em 73,81% (62/84). Desenvolvimento de tumor em glândula mamária remanescente foi
12 constatado em 29,03% (18/62) das cadelas que foram submetidas à mastectomia total unilateral. O
13 TDTMR foi de 279,68 \pm 317,75 dias (9,32 \pm 10,59 meses).

14 Ao final do estudo 57,14% (48/84) vieram a óbito, com tempo médio de SG de 483,42 \pm 319,17
15 dias (16,1 \pm 10,6 meses) (Figura 2). Em relação à expressão de estrógeno, 29,17% (14/48) das cadelas
16 que vieram a óbito foram positivas e 70,83% (34/48) foram negativas e não houve correlação da
17 expressão de RE α com o tempo de SG ($p=0,062$) (Figura 3 – A). A recidiva local ou metástase ocorreu
18 em 30,77% (8/26) das cadelas que foram positivas para RE α e em 46,55% (27/58) das negativas e não
19 houve correlação entre o ILD e a imunoposição de RE α ($p= 0,201$) (Figura 3 – B).

20 Do mesmo modo, não houve correlação entre a imunoposição de RE α e o TDTMR das cadelas
21 avaliadas nesse estudo ($p= 0,315$) (Figura 3– C). Desenvolvimento de tumor em glândula mamária
22 remanescente ocorreu em 15,38% (4/26) das cadelas positivas para RE α e em 24,14% (14/58) das
23 negativas.

24 O desenvolvimento de tumor em mama remanescente (IBTR) na mulher varia de 2%
25 (ARVOLD et al., 2011), 4,89% (TINTERRI et al., 2014), 7,4% (CORSO et al., 2018), 20,5%
26 (ISHITOBI et al., 2015) e 30% (NIELSEN et al., 2006). Enquanto que o desenvolvimento de tumor em
27 mama contralateral (CBC) é relatado em 1,4% (TINTERRI et al., 2014), 3,4% (CORSO et al., 2018),
28 4% (NIELSEN et al., 2006) e até 8% (BARTELINK et al., 2015) das mulheres com tumor de mama. O
29 desenvolvimento de IBTR e CBC em mulheres têm correlação com idade, fatores genéticos, além de
30 fatores clinicopatológicos como tamanho tumoral, graduação e tipo histológico, status nodal, tipo de
31 mastectomia além do tratamento pós cirúrgico (CORSO et al., 2018; ISHITOBI et al., 2015; NIELSEN
32 et al., 2006; TINTERRI et al., 2014).

33 Diferentemente dos resultados observados nas cadelas deste estudo, a presença de CBC e/ou
34 IBTR na mulher estão relacionadas com ausência de expressão de RE e RP nos tumores mamários
35 (ARVOLD et al., 2011; CORSO et al., 2018). Por outro lado, Corso et al. (2018), também verificaram
36 que, apesar da SG diminuir em mulheres com IBTR e CBC, não houve correlação entre SG e IBTR e
37 CBC.

1 Estudos prévios também não verificaram correlação entre expressão de RE α em TMC e
2 sobrevida (CHANG et al., 2009; MILLANTA et al., 2005). Chang et al. (2009) avaliaram a expressão
3 de RE α e RP e verificaram que dentre estes dois hormônios a expressão de PR é que pode ser considerada
4 como melhor fator prognóstico, sendo que cadelas que apresentam menor expressão de PR tem menor
5 sobrevida. Estes autores ainda verificaram que a sobrevida era menor em cadelas RE α positivas e RP
6 negativas.

7 O desenvolvimento do tumor mamário é evento já programado nos primeiros anos de vida da
8 cadela e não é influenciado pela supressão do estímulo hormonal na maturidade (FONSECA; DALECK,
9 2000). O estrógeno pode atuar por ligação a RE α presente em células epiteliais e estromais da glândula
10 mamária induzindo nestas células uma expressão aumentada de receptores de progesterona. Dentro essa
11 hipótese, o estrógeno atuaria no estágio inicial da doença e uma perda progressiva de RE α ocorreria
12 durante a evolução da doença, resultando em não-reatividade de RE α em carcinomas mamários
13 (MILLANTA et al., 2005).

14 Na cadela, a expressão de RE e RP é maior em neoplasias benignas de mama e somente uma
15 parte das neoplasias malignas apresentam esses receptores e em concentrações menores, pois com a
16 progressão do tumor e aumento da malignidade há redução da dependência hormonal e maior autonomia
17 das células neoplásicas (GERALDES; GARTNER; SCHMITT, 2000). Além disso, há correlação
18 inversa entre o número de receptores para estrógeno com a atividade da glucose6-fosfatase e da 6-
19 fosfogluconato-desidrogenase, enzimas conhecidas por estarem relacionadas com a malignidade das
20 células neoplásicas (NERURKAR et al., 1990).

21 Outro fator a ser considerado para a falta de correlação entre expressão de RE α e sobrevida é
22 que, apesar da detecção dos RE α pelo método de imunohistoquímica, nem todos os receptores
23 demonstrados podem ser funcionais, devido a defeito na cascata funcional do RE em níveis de
24 transcrição, tradução e pós-traducionais (BARNES et al., 1998).

25 Ainda, alguns autores defendem a necessidade de interação de marcadores moleculares
26 endócrinos com marcadores moleculares de prognóstico como cicloxigenase 2 (Cox-2), microsomal
27 PGE sintetase 1 (mPGES-1) (MILLANTA et al., 2014) e PR, Ki-67, P53, HER-2, CK5/14 dentre outros,
28 para realização de classificação molecular e comparação com sobrevida (CHANG et al., 2009; DE LAS
29 MULAS; MILLÁN; DIOS, 2005; GAMA; ALVES; SCHMITT, 2008; KIM et al., 2016; SASSI et al.,
30 2010; TOLEDO et al., 2016).

31 Na mulher (YAMASHITA et al., 2006) e nas cadelas (CHANG et al., 2009; DE LAS
32 MULAS; MILLÁN; DIOS, 2005) a expressão de RE α e PR no tumor mamário apresenta melhor
33 prognóstico, quando se compara com a imunoeexpressão de RE α isoladamente. Além disso, expressão
34 do RE α também já foi associada a outros fatores prognósticos como estadiamento clínico, tamanho
35 tumoral e metástases (CHANG et al., 2009).

1 Conclusão

2 A idade é fator de prognóstico nos tumores mamários de cadelas e neoplasias de menor grau
3 histológico expressam RE α . A avaliação isolada deste marcador molecular não é considerada um bom
4 fator de prognóstico quando se considera sobrevida global, tempo livre de doença e o tempo de
5 desenvolvimento de tumor em mama remanescente.

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

1 Referências

- 2 ARVOLD, N. D.; TAGHIAN, A.G.; NIEMIERKO, A. ABI RAAD, R.F.; SREEDHARA, M.;
3 NGUYEN, P.L.; BELLON, J. R.; WONG, J.S.; SMITH, B.L.; HARRIS, J.R. Age, breast cancer
4 subtype approximation, and local recurrence after breast-conserving therapy. *Journal of Clinical*
5 *Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, v. 29, n. 29, p. 3885–3891,
6 10 out. 2011. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.36.1105>
7
- 8 AYRES, M.; AYRES JÚNIOR, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S. BioEstat: Aplicações estatísticas
9 nas áreas das ciências bio-médicas. *Versão 5.0*, 2007.
10
- 11 BARNES, D. M.; MILLIS, R.R.; BEECH, L.V.A.M., THORPE, S.M.; LEAKE, R.E. Increased use of
12 immunohistochemistry for oestrogen receptor measurement in mammary carcinoma: the need for
13 quality assurance. *European Journal of Cancer*, v. 34, n. 11, p. 1677–1682, 1998.
14 [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(98\)00149-X](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(98)00149-X)
15
- 16 BARTELINK, H. et al. Whole-breast irradiation with or without a boost for patients treated
17 with breast-conserving surgery for early breast cancer: 20-year follow-up of a randomised
18 phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*, v. 16, n. 1, p. 47–56, jan. 2015.
19 [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71156-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71156-8)
- 20 BEAUVAIS, W.; CARDWELL, J. M.; BRODBELT, D. C. The effect of neutering on the risk of
21 mammary tumours in dogs – a systematic review. *Journal of Small Animal Practice*, v. 53, n. 6, p.
22 314–322, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2011.01220.x>
- 23 CASSALI, G.D.; LAVALLE, G.E.; FERREIRA, E.; ESTRELA-LIMA, A.; DE NARDI, A.B.;
24 GHEVER, C.; SOBRAL, R.A.; AMORIM, R.L.; OLIVEIRA, L.O.; SUEIRO, F.A.R.; BESERRA,
25 H.E.O.; BERTAGNOLLI, A.C.; GAMBA, C.O.; DAMASCENO, K.A.; CAMPOS, C.B.; ARAUJO,
26 M.R.; CAMPOS, L.C.; MONTEIRO, L.N.; NUNES, F.C.; HORTA, R.S.; REIS, D.C.; LUVIZOTTO,
27 M.C.R.; MAGALHÃES, G.M.; RAPOSO, J.B.; FERREIRA, A.M.R.; TANAKA, N.M.; GRANDI, F.;
28 UBUKATA, R.; BASTCHINSKI, K.; TERRA, E.M.; SALVADOR, R.C.L.; JARK, P.C.;
29 DELECRODI, J.D.R.; NASCIMENTO, N.A.; SILVA, D.N.; SILVA, L.P.; FERREIRA, K.C.R.S.;
30 FREHSE, M.S.; DI SANTIS, G.W.; SILVA, E.O.; GUIM, T.N.; KERR, B.; CINTRA, P.P.; SILVA,
31 F.B.F.; LEITE, J.S.; MELLO, M.F.V.; FERREIRA, M.L.G.; FUKUMASU, H.; SALGADO, B.S.;
32 TORRES, R. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors
33 2013. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, p. 38–69, 2014.
- 34 CHANG, C.C; TSAI, M.H.; LIAO, J.W.; CHAN, J.P.W.; WONG, M.L.; CHANG, S.C. Evaluation of
35 hormone receptor expression for use in predicting survival of female dogs with malignant mammary
36 gland tumors. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 235, n. 4, p. 391–396, 2009.
37 <https://doi.org/10.2460/javma.235.4.391>
- 38 CINTRA, P. P. *Comparações das imunomarcações de células-tronco tumorais (CD44+/CD24-) em*
39 *tumores mamários triplo negativos em cadelas e mulheres*, 2015. Dissertação (Mestrado) –
40 Universidade de Franca, Franca.
- 41 CORSO, G. et al. Ipsilateral Breast Tumor Reappearance and Contralateral Breast Cancer
42 after Primary Breast Cancer Treatment: A Comprehensive Retrospective Study of 15,168
43 Patients. *Oncology*, v. 95, n. 3, p. 147–155, 2018. <https://doi.org/10.1159/000488764>
- 44 DE LAS MULAS, J. M.; MILLÁN, Y.; DIOS, R. A prospective analysis of immunohistochemically
45 determined estrogen receptor alpha and progesterone receptor expression and host and tumor factors
46 as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. *Veterinary Pathology*, v. 42, n. 2,
47 p. 200–212, 2005. <https://doi.org/10.1354/vp.42-2-200>

- 1 DIAS, M. L. M.; ANDRADE, J.M.L.; DE CASTRO, M.B.; GALERA, P.D. Survival analysis of
2 female dogs with mammary tumors after mastectomy: epidemiological, clinical and morphological
3 aspects. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 36, n. 3, p. 181–186, 2016. [https://doi.org/10.1590/S0100-](https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016000300006)
4 [736X2016000300006](https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016000300006)
- 5 DOLKA, I.; KRÓL, M.; SAPIERZYŃSKI, R. Evaluation of apoptosis-associated protein (Bcl-2, Bax,
6 cleaved caspase-3 and p53) expression in canine mammary tumors: An immunohistochemical and
7 prognostic study. *Research in Veterinary Science*, v. 105, p. 124–133, 2016.
8 <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.02.004>
- 9 ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of
10 histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up.
11 *Histopathology*, v. 19, n. 5, p. 403–410, 1991. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x>
- 12 FONSECA, C. S.; DALECK, C. R. Canine mammary tumors: hormonal influence and effects of
13 ovariectomy as an adjuvant therapy. *Ciência Rural*, v. 30, n. 4, p. 731–735, 2000.
14 <https://doi.org/10.1590/S0103-84782000000400030>
- 15 FUQUA, S. A.; FITZGERALD, S.D.; CHAMNESS, G.C.; TANDON, A.K.; MCDONNELL, D.P.;
16 NAWAZ, Z.; O'MALLEY, B.W.; MCGUIRE, W.L. Variant human breast tumor estrogen receptor
17 with constitutive transcriptional activity. *Cancer Research*, v. 51, n. 1, p. 105–109, 1991.
- 18 GAMA, A.; ALVES, A.; SCHMITT, F. Identification of molecular phenotypes in canine mammary
19 carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Archiv: An*
20 *International Journal of Pathology*, v. 453, n. 2, p. 123–132, 2008. [https://doi.org/10.1007/s00428-](https://doi.org/10.1007/s00428-008-0644-3)
21 [008-0644-3](https://doi.org/10.1007/s00428-008-0644-3)
- 22 GERALDES, M.; GARTNER, F.; SCHMITT, F. Immunohistochemical study of hormonal receptors
23 and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours.
24 *Veterinary Record*, v. 146, n. 14, p. 403–406, 2000. <https://doi.org/10.1136/vr.146.14.403>
- 25 GOLDSCHMIDT, M.H.; PEÑA, L.; ZAPPULLI, V. Tumours of the mammary gland. In: Meuten, D.J.
26 *Tumors in domestic animals*. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2017. 5ed, p.723-765.
27 <https://doi.org/10.1002/9781119181200.ch17>
28
- 29 GUNDIM, L. F.; DE ARAÚJO, C.D.; BLANCA, W.T.; GUIMARÃES, E.C.; MEDEIROS, A.A.
30 Clinical staging in bitches with mammary tumors: Influence of type and histological grade. *Canadian*
31 *Journal of Veterinary Research*, v. 80, n. 4, p. 318–322, 2016.
- 32 HAMMOND, M. E. H.; HAYES, D.F.; DOWSETT, M.; ALLRED, D.C.; HAGERTY, K.L.; BADVE,
33 S.; FITZGBBONS, P.L.; FRANCIS, G.; GOLDSTEIN, N.S.; HAYES, M.; HICKS, D.G.; LESTER,
34 S.; LOVE, R.; MANGU, P.B.; MCSHANE, L.; MILLER, K.; OSBORNE, C.K.; PAIK, S.;
35 PERLMUTTER, J.; RHODES, A.; SASANO, H.; SCHWARTZ, J.N.; SWEEP, F.C.G.; TAUBE, S.;
36 TORLAKOVIC, E.E.; VALENSTEIN, P.; VIALE, G.; VISSCHER, D.; WHEELER, T.;
37 WILLIAMS, R.B.; WITTLIFF, J.L.; WOLFF, A.C. American Society of Clinical Oncology/College of
38 American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen
39 and Progesterone Receptors in Breast Cancer (Unabridged Version). *Archives of Pathology &*
40 *Laboratory Medicine*, v. 134, n. 7, p. e48–e72, 2010.
- 41 ILLERA, J. C.; PÉREZ-ALENZA, M.D.; NIETO, A.; JIMÉNEZ, M.A.; SILVAN, G.; DUNNER, S.;
42 PEÑA, L. Steroids and receptors in canine mammary cancer. *Steroids*, v. 71, n. 7, p. 541–548, 2006.
43 <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2005.11.007>

- 1 ISHITOBI, M. et al. Distant Recurrence Risk after Late Ipsilateral Breast Tumor Recurrence:
 2 Results of a Retrospective, Single-Institution Study. *Oncology*, v. 89, n. 5, p. 269–274, 2015.
 3 <https://doi.org/10.1159/000437440>
- 4 KABIR, F. M. L.; DEINNOCENTES, P.; ARGAWAL, P.; MILL, C.P.; RIESE, D.J.; BIRD, C.
 5 Estrogen receptor- α , progesterone receptor, and c-erbB/HER-family receptor mRNA detection and
 6 phenotype analysis in spontaneous canine models of breast cancer. *Journal of Veterinary Science*, v.
 7 18, n. 2, p. 149–158, 2017. <https://doi.org/10.4142/jvs.2017.18.2.149>
- 8 KARAYANNOPOULOU, M.; KALDRYMIDOU, E.; CONSTANTINIDIS, T.C.; DESSIRIS, A.
 9 Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human
 10 grading method. *Journal of Comparative Pathology*, v. 133, n. 4, p. 246–252, 2005.
 11 <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2005.05.003>
- 12 KIM, H.; JANG, Y.G.; SHIN, J.I.; SEUNG, B.J.; JU, J.H.; LEE, S.M.; SUR, J.H. Evaluation of Tumor
 13 Prognostic Markers in Malignant Canine Mammary Carcinoma. *Pakistan Veterinary Journal*, p. 6,
 14 2016.
- 15 KLEINBAUM, D.G.; KLEIN, M. *Survival analysis: a self-learning text*. New York: Springer, 1995.
 16 <https://doi.org/10.2307/2532873>
- 17 LAVALLE, G. E.; CAMPOS, C.B.; BERTAGNOLLI, A.C.; CASSALI, G.D. Cox-2 expression in
 18 canine mammary carcinomas: correlation with angiogenesis and overall survival. *Veterinary*
 19 *Pathology*, v. 46, n. 6, p. 1275–1280, 2009. <https://doi.org/10.1354/vp.08-VP-0226-C-FL>
- 20 MAINENTI, M.; RASOTTO, R.; CARNIER, P.; ZAPPULLI, V. Oestrogen and progesterone receptor
 21 expression in subtypes of canine mammary tumours in intact and ovariectomised dogs. *The Veterinary*
 22 *Journal*, v. 202, n. 1, p. 62–68, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.06.003>
- 23 MCGUIRE, W. L.; CHAMNESS, G. C.; FUQUA, S. A. Estrogen receptor variants in clinical breast
 24 cancer. *Molecular Endocrinology*, v. 5, n. 11, p. 1571–1577, 1991. <https://doi.org/10.1210/mend-5-11-1571>
- 26 MILLANTA, F.; CANDRELLA, M.; BARI, G.; NICOLLINI, M.; VANNOZZI, I.; POLI, A.
 27 Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline
 28 mammary tissues. *Research in Veterinary Science*, v. 79, n. 3, p. 225–232, 2005.
 29 <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.02.002>
- 30 MILLANTA, F.; ASPRONI, P.; CANALES, A.; CITI, S.; POLI, A. COX-2, mPGES-1 and EP2
 31 receptor immunohistochemical expression in canine and feline malignant mammary tumours.
 32 *Veterinary and Comparative Oncology*, v. 14, n. 3, p. 270–280, 2014.
 33 <https://doi.org/10.1111/vco.12096>
- 34 MORRIS, J. S.; NIXON, C.; KING, O.J.A.; MORGAN, I.M.; PHILBEY, A.W. Expression of
 35 TopBP1 in canine mammary neoplasia in relation to histological type, Ki67, ER α and p53. *The*
 36 *Veterinary Journal*, v. 179, n. 3, p. 422–429, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.10.025>
- 37 NADJI, M.; GOMEZ-FERNANDEZ, C.; GANJEI-AZAR, P.; MORALES, A.R.
 38 Immunohistochemistry of Estrogen and Progesterone Receptors Reconsidered: Experience With 5,993
 39 Breast Cancers. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 123, n. 1, p. 21–27, 2005.
 40 <https://doi.org/10.1309/4WV79N2GHJ3X1841>
- 41 NERURKAR, V. R.; ISHWARD, C.S.; SESHADRI, R.; NAIK, S.N.; LALITHA, V.S. Glucose-6-
 42 phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase activities in normal canine
 43 mammary gland and in mammary tumours and their correlation with oestrogen receptors. *Journal of*

- 1 *Comparative Pathology*, v. 102, n. 2, p. 191–195, 1990. <https://doi.org/10.1016/S0021->
2 [9975\(08\)80124-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(08)80124-7)
- 3 NIELSEN, H. M. et al. Study of failure pattern among high-risk breast cancer patients with or
4 without postmastectomy radiotherapy in addition to adjuvant systemic therapy: long-term
5 results from the Danish Breast Cancer Cooperative Group DBCG 82 b and c randomized
6 studies. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical*
7 *Oncology*, v. 24, n. 15, p. 2268–2275, 20 maio 2006.
8 <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.02.8738>
- 9 NIETO, A.; PEÑA, L.; PEREZ-ALENZA, M.D.; SÁNCHEZ, M.A.; FLORES, M.J.; CASTAÑO, M.
10 Immunohistologic Detection of Estrogen Receptor Alpha in Canine Mammary Tumors: Clinical and
11 Pathologic Associations and Prognostic Significance. *Veterinary Pathology*, v. 37, n. 3, p. 239–247,
12 2000. <https://doi.org/10.1354/vp.37-3-239>
- 13 OWEN, L. N. TNM Classification of Tumours in Domestic Animals. Owen. 1980.
- 14 PEÑA, L.; GAMA, A.; GOLDSCHMIDT, M.H.; ABADIE, J.; BENAZZI, C.; CASTAGNARO, M.;
15 DíEZ, L.; GÄRTER, F.; HELLMÉN, E.; KIUPEL, M.; MILLÁN, Y.; MILLER, M.A.; NGUYEN, F.;
16 POLI, A.; SARLI, G.; ZAPPULLI, V.; DE LAS MULAS, J.M. Canine Mammary Tumors: A Review
17 and Consensus of Standard Guidelines on Epithelial and Myoepithelial Phenotype Markers, HER2,
18 and Hormone Receptor Assessment Using Immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, v. 51, n. 1,
19 p. 127–145, 2014. <https://doi.org/10.1177/0300985813509388>
- 20 PETROV, E. A.; GJUROVSKI, I.; RISTOSKI, T.; NIKOLOVSKI, G.; TRENKOSKA, P.;
21 TROJACANEC, P.; ILIEVSKA, K.; DOVENSKI, T.; PETRUSHEVSKA, G. Immunohistochemical
22 Detection of Estrogen Receptors in Canine Mammary Tumors. *Macedonian Veterinary Review*, v. 39,
23 n. 1, 2016. <https://doi.org/10.1515/macvetrev-2016-0073>
- 24 PHILIBERT, J. C.; SYNDER, P.W.; GLICKMAN, N.; GLICKMAN, L.T.; KNAPP, D.W.;
25 WATERS, D.J. Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors.
26 *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 17, n. 1, p. 102–106, 2003. <https://doi.org/10.1111/j.1939->
27 [1676.2003.tb01330.x](https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2003.tb01330.x)
- 28 RASOTTO, R.; BERLATO, D.; GOLDSCHMIDT, M.H.; ZAPPULLI, V. Prognostic Significance of
29 Canine Mammary Tumor Histologic Subtypes: An Observational Cohort Study of 229 Cases:
30 *Veterinary Pathology*, 2017. <https://doi.org/10.1177/0300985817698208>
- 31 SANTOS, A. A.; LOPES, C.C.; RIBEIRO, J.R.; MARTINS, L.R.; SANTOS, J.C.; AMORIM, I.F.;
32 GÄRTNER, F.; MATOS, A.J. Identification of prognostic factors in canine mammary malignant
33 tumours: a multivariable survival study. *BMC Veterinary Research*, v. 9, n. 1, p. 1, 2013.
34 <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-1>
- 35 SASSI, F.; BENAZZI, C.; CASTELLANI, G.; SARLI, G. Molecular-based tumour subtypes of canine
36 mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. *BMC Veterinary Research*, v. 6, n. 1, p. 5,
37 2010. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-6-5>
- 38 SORENMO, K.U.; DEANNA, R.W.; GOLDSMIDT, R.H. Tumors of the mammary gland. In:
39 Withrow and AC Ewen's *Small Animal Clinical Oncology*. Philadelphia: Saunders, 2013. 5 ed, p. 553
40 – 571. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-2362-5.00027-X>
41
- 42 SORENMO, K. U.; RASOTTO, R. ZAPPULLI, V.; GOLDSCHMIDT, M.H. Development, anatomy,
43 histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary
44 gland neoplasms. *Veterinary Pathology*, v. 48, n. 1, p. 85–97, 2011.
45 <https://doi.org/10.1177/0300985810389480>

- 1 TINTERRI, C. et al. Breast-conservative surgery with and without radiotherapy in patients
2 aged 55-75 years with early-stage breast cancer: a prospective, randomized, multicenter trial
3 analysis after 108 months of median follow-up. *Annals of Surgical Oncology*, v. 21, n. 2, p.
4 408–415, fev. 2014. <https://doi.org/10.1245/s10434-013-3233-x>
- 5 TOLEDO, G. N.; SILVA, P.D.A.; BORGES, B.N.; MONTEIRO, F.O.B.; FELICIANO, M.A.R.
6 Specific cellular biomarkers for canine's breast cancer: literature review. *Revista de Ciências*
7 *Agrárias/Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, v. 59, n. 2, p. 212–218,
8 2016. <https://doi.org/10.4322/rca.2391>
- 9 TORÍBIO, J. M. DE M. L.; ESTRELA LIMA, A.; MARTINS FILHO, E.F.; RIBEIRO, L.G.R.;
10 D'ASSIS, M.J.M.H.; TEIXEIRA, R.G.; DAMASCENO, K.A.; CASSALI, G.D.; COSTA NETO, J.M.
11 Clinical characterization, histopathologic diagnosis and geoprocessing of mammary tumours in bitches
12 from the city of Salvador, Bahia State. *Revista Ceres*, v. 59, n. 4, p. 427–433, 2012.
13 <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2012000400001>
- 14 YAMASHITA, H.; ANDO, Y.; NISHIO, M.; ZHANG, Z.; HAMAGUCHI, M.; MITA, K.;
15 KOBAYASHI, S.; FUJII, Y.; IWASE, H. Immunohistochemical evaluation of hormone receptor
16 status for predicting response to endocrine therapy in metastatic breast cancer. *Breast Cancer*, v. 13, n.
17 1, p. 74–83, 2006. <https://doi.org/10.2325/jbcs.13.74>
- 18 YANG, W.Y. LIU, C.H.; CHANG, C.J.; LEE, C.C.; CHANG, K.J.; LIN, C.T. Proliferative Activity,
19 Apoptosis and Expression of Oestrogen Receptor and Bcl-2 Oncoprotein in Canine Mammary Gland
20 Tumours. *Journal of Comparative Pathology*, v. 134, n. 1, p. 70–79, 2006.
21 <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2005.07.002>
- 22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37

1 Tabela 1. Aspectos clinicopatológicos e tumorais de cadelas com neoplasia mamária, Uberlândia- MG, 2018

Características	n (%)
Idade \pm DP, Mínimo/Máximo (anos)	10,14 \pm 2,82 (4-17)
< 8 anos	13 (15,47%)
\geq 8 anos	71 (84,53%)
Raça	
SRD	41 (48,81%)
Poodle	14 (16,67%)
Pinscher	6 (7,14%)
Yorkshire	5 (5,96%)
Dachshund	4 (4,76%)
Basset	3 (3,57%)
Pit Bull	3 (3,57%)
Cocker	2 (2,38%)
Shitzu	2 (2,38%)
Outras (Pastor alemão, Lhasa e Rotweiller)	4 (4,76%)
Tamanho tumoral	
T1 (< 3 cm)	34 (40,47%)
T2 (3 a 5 cm)	21 (25%)
T3 (> 5 cm)	29 (34,53%)
Carcinomas	
Carcinomas simples	
Carcinoma tubulopapilar	29 (34,52%)
Carcinoma sólido	11 (13,10%)
Carcinoma tubular	4 (4,76%)
Carcinoma em tumor misto	1 (1,19%)
Carcinoma complexo	38 (45,24%)
Carcinossarcoma	1 (1,19%)
Grau histológico	
I	35 (41,67%)
II	37 (44,04%)
III	12 (14,29%)
TNM	
I	25 (29,77%)
II	13 (15,48%)
III	12 (14,28%)
IV	26 (30,95%)
V	8 (9,52%)

2

3

4 Tabela 2. Regressão multivariada de Cox com risco relativo e intervalo de confiança de 95% para variáveis
5 preditoras e sobrevida global de cadelas com carcinoma mamário, Uberlândia- MG, 2018

Variáveis	Erro Padrão	p-valor	Taxa de risco	IC (95%)
Idade	0,076	0,028*	1,181	1,017 – 1,371
Raça	0,386	0,707	0,864	0,405 – 1,844
Tamanho do tumor	0,282	0,086	0,616	0,354 – 1,072
TNM	0,153	0,265	1,186	0,877 – 1,604
Subtipo histológico	0,123	0,320	0,885	0,695 – 1,126
Grau histológico	0,239	0,506	1,172	0,733 – 1,873
Expressão de estrogênio	0,707	0,069	0,616	0,989 – 1,299

6 *P < 0.05 é considerado significativo.

7

8

9

10

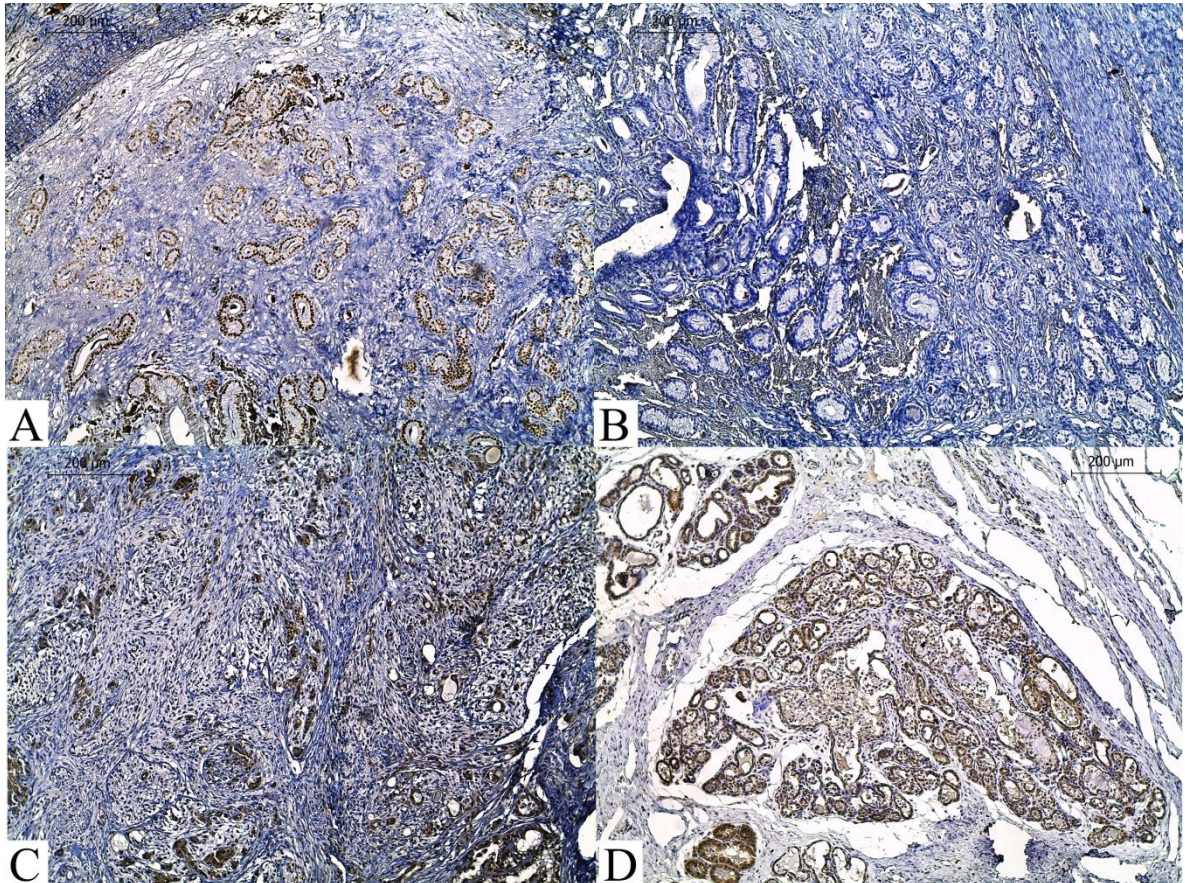
1 Tabela 3. Correlação entre aspectos clinicopatológicos de cadelas com neoplasias mamárias e imunexpressão de
 2 estrógeno, Uberlândia – MG, 2018

Características	Positivas (n= 26)	Negativas (n= 58)	p-valor
Idade			0,631¹
< 8 anos	4 (15,38%)	9 (15,52%)	
≥ 8 anos	22 (84,62%)	49 (84,48%)	
Raças			0,477¹
SRD	13 (50,00%)	27 (46,55%)	
Raça Pura	13 (50,00%)	31 (53,45%)	
Tamanho tumoral			0,595²
T1 (≤ 3 cm)	9 (34,62%)	25 (43,10%)	
T2 (> 3 e ≤ 5 cm)	6 (23,08%)	15 (25,86%)	
T3 (> 5 cm)	11 (42,30%)	18 (31,04%)	
Subtipo histológico			0,601³
Carcinoma complexo	13 (50,00%)	25 (43,10%)	
Carcinoma simples	13 (50,00%)	32 (55,18%)	
Carcinossarcoma	0 (0,0%)	1 (1,72%)	
Grau histológico			0,042^{2*}
I	13 (50,00%)	22 (37,93%)	
II	13 (50,00%)	24 (41,38%)	
III	0 (0,00%)	12 (20,59%)	
TNM			0,522^{2*}
I, II, III	15 (57,69%)	35 (60,35%)	
IV e V	11 (42,31%)	23 (39,65%)	

3 *P < 0.05 é considerado significativo. ¹Teste exato de Fisher, ²Qui-quadrado, ³Teste de Mann-Whitney.

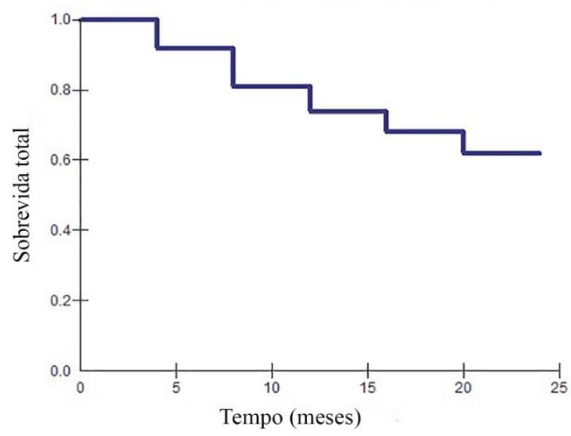
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

- 1 Figura 1. Fotomicrografias de imunopressão de estrógeno. A- Útero de cadela com núcleos de células epitelial
2 glandulares marcadas, IHQ, 100x, 200 μm . B- Útero de cadela. Notar ausência de marcação para estrógeno em
3 células epiteliais glandulares, IHQ, 100x, 200 μm . C- Carcinoma complexo mamário com células neoplásicas
4 imunomarcadas, IHQ, 100x, 200 μm . D- Carcinoma tubulopapilar com núcleos de células neoplásicas marcadas
5 por estrógeno, IHQ, 100x, 200 μm , Uberlândia – MG, 2018
6



- 7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

1 Figura 2. Curva Kaplan Meier do tempo de sobrevida global de cadelas com neoplasia mamária.



2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

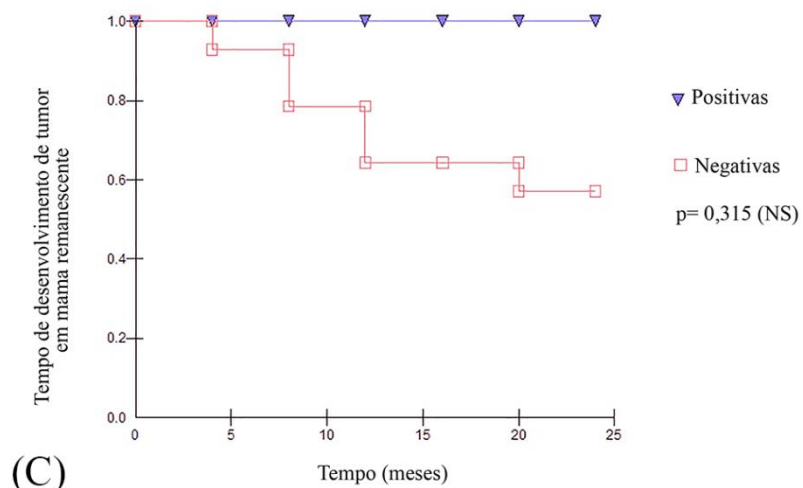
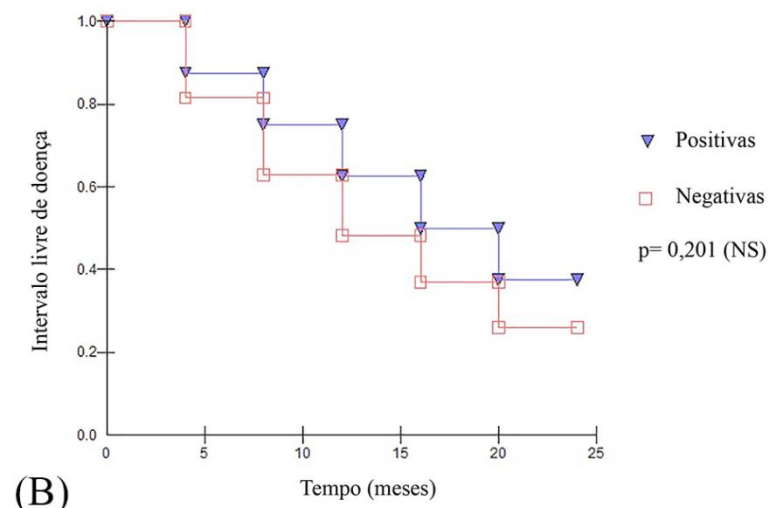
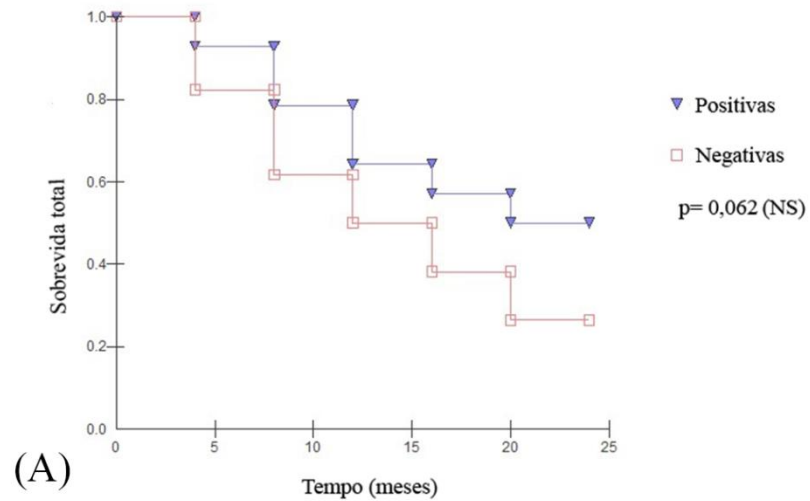
23

24

25

26

1 Figura 3. Teste Log-Rank da análise da expressão de estrogênio em neoplasias mamárias de cadelas com relação
 2 a: A) Sobrevida global ($p=0,062$); B) Intervalo livre de doença ($p=0,201$); e C) Tempo de desenvolvimento de
 3 tumor em mama remanescente ($p=0,315$). NS= não significativo.



5

6

CAPÍTULO 3 - Fenótipo triplo negativo em carcinomas mamários de cadelas e correlação com fatores de prognóstico e sobrevida

Artigo a ser submetido na Revista Veterinary and Comparative Oncology (ISSN:1476-5829)

Fenótipo triplo negativo em carcinomas mamários de cadelas e correlação com fatores de prognóstico e sobrevida

Número de palavras: 3857

Número de figuras: 3

Número de tabelas: 5

Conflitos de interesse: Os autores não têm conflitos de interesse para reportar.

Resumo

O fenótipo triplo negativo é caracterizado pela ausência de expressão de receptores de estrógeno (RE) e progesterona (RP) e HER2. Acomete principalmente cadelas idosas, intactas e quando diagnosticado, apresenta comportamento agressivo, prognóstico desfavorável e menor sobrevida. Relatos de frequência, comportamento clínico, fatores de prognóstico e sobrevida deste fenótipo em cadelas são escassos, sendo assim os objetivos deste estudo foram: verificar a frequência do fenótipo triplo negativo em CMC e sua associação com sobrevida e verificar a relação deste fenótipo com parâmetros clinicopatológicos. Foram incluídas neste estudo 84 cadelas. Elas foram submetidas a exame radiográfico e de ultrassonografia, para avaliação de metástases pulmonares e a distância, e realizaram como tratamento mastectomia unilateral total ou bilateral total. As amostras de neoplasias mamárias foram avaliadas quanto ao tipo histológico, invasividade estromal, e a expressão de RE, RP e HER2 por meio de imunohistoquímica. Realizou-se a avaliação do tempo de sobrevida global (SG), do intervalo livre de doença (ILD) e o tempo de desenvolvimento de tumor em mama remanescente (TDTMR). Em 21,43% foram identificados CMC triplo negativo (CMCTN). Nenhum dos parâmetros clinicopatológicos avaliados (tipo e grau histológico, estádios clínicos, invasividade estromal, idade, tamanho e localização tumoral) diferiram significativamente entre os dois grupos de CMC (triplo negativos e não triplo negativos), exceto a castração. Na análise multivariada, observou-se correlação da castração com a ST ($p=0,01$) ($471,42\pm 353,45$ dias). O comportamento dos CMCTN parece menos agressividade quando comparado com a mulher. Assim como ocorre com CMC em geral, a castração pode influenciar na ocorrência de CMCTN.

Palavras chave: castração, estrógeno, HER2, progesterona

1 Introdução

O carcinoma mamário canino (CMC) é uma doença frequente e complexa, com aspectos morfológicos, clínicos, fenotípicos e moleculares heterogêneos^{1,2}. Esta heterogeneidade é evidente quando tumores mamários do mesmo tipo histológico demonstram um comportamento clínico diferente,³ dificultando a determinação de um prognóstico definitivo¹.

No câncer de mama humano, assim como na cadela, tamanho do tumor, tipo e grau histológico e presença de metástases são usados para determinar o prognóstico⁴⁻⁸ e, na mulher, o tratamento⁴. Ademais, faz parte da avaliação de rotina das pacientes a investigação da imunexpressão de marcadores moleculares como receptores de estrógeno (RE), receptores de progesterona (RP) e o fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) visando a classificação molecular da neoplasia, assim como a definição da estratégia terapêutica e determinação do prognóstico⁹.

A ausência de expressão de RE, RP e HER2 caracteriza o fenótipo triplo negativo, tanto na mulher¹⁰ como na cadela³. Na mulher, este fenótipo é relevante considerando a facilidade de identificação na rotina clínica, a agressividade, a ausência de terapia específica e o comportamento clínico⁹. Representa 10% a 17% das neoplasias^{11,12}, é diagnosticado em mulheres pré menopausa^{13,14}. O carcinoma mamário canino triplo negativo (CMCTN) acomete principalmente cadelas intactas, com mais de 10 anos^{3,14,15} sendo relatadas as frequências de 15,5%¹⁵, 18,7%³ e 76,3%¹⁶. CMCTN também apresenta comportamento agressivo, prognóstico desfavorável e menor sobrevida³.

Assim como na mulher¹², estudos tem associado menor sobrevida ao fenótipo triplo negativo em cadelas^{16,17}. O risco de morte em cadelas com este fenótipo tumoral pode ser influenciado pelo tamanho tumoral, o processo inflamatório peritumoral e a presença de metástases tanto em linfonodos como à distância¹⁶.

Relatos de frequência, comportamento clínico, fatores de prognóstico e sobrevida do CMCTN são escassos³ sendo que a maioria estudos se referem ao tipo molecular basal like. A ausência de expressão de receptores hormonais e HER2 é comum aos tipos moleculares basal like e normal like. Por apresentarem características clínicas, morfológicas e fenotípicas semelhantes o fenótipo triplo negativo, na mulher¹⁸⁻²² e na cadela³, é considerado correspondente ao tipo basal like.

Os objetivos deste estudo foram: verificar a frequência do fenótipo triplo negativo em CMC e sua associação com sobrevida; verificar a relação deste fenótipo com parâmetros clinicopatológicos e contribuir para a determinação do valor prognóstico do fenótipo triplo negativo em cadelas.

2 Material e métodos

2.1 Pacientes e características tumorais

Foram incluídas neste estudo 84 cadelas, diagnosticadas com carcinoma mamário no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Minas Gerais, Brasil. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA – UFU - protocolo nº127/15).

Os critérios de inclusão no estudo foram: cadelas intactas ou castradas com tumor de mama, submetidas a exame clínico, radiográfico e ultrassonografia, para avaliação de metástases pulmonares e a distância, e que realizaram exérese cirúrgica como tratamento para o tumor de mama (mastectomia unilateral total ou bilateral total). Foram excluídas do estudo cadelas com histórico de uso de fármacos que pudessem interferir com o desenvolvimento tumoral (drogas anti neoplásicas, anti-inflamatórios) e que foram submetidas à nodulectomia.

Ao exame físico da glândula mamária, o tamanho do tumor foi aferido com auxílio de um paquímetro e posteriormente classificado em T1 (<3cm), T2 (3 a 5cm) e T3 (>5cm) ²³. Após a exérese cirúrgica, amostras das neoplasias mamárias e dos linfonodos regionais (axilares ou inguinais) foram coletadas e acondicionadas em frascos com formol 10% tamponado. As amostras foram fixadas por 48 horas e submetidas a processamento histológico de rotina para confecção de lâminas coradas em hematoxilina e eosina.

A avaliação histológica foi realizada por dois patologistas e as neoplasias mamárias foram classificadas histologicamente de acordo com Goldsmith et al (2017) ²⁴ e graduação histológica conforme Elston & Ellis (1991) ²⁵. Considerando a proposta analítica deste estudo, quando a cadela possuía mais de um nódulo neoplásico maligno, com tipos histológicos diferentes, considerou-se o tipo histológico mais agressivo ⁸. Os linfonodos também foram avaliados microscopicamente e o estágio clínico das cadelas foi estabelecido utilizando-se sistema TNM ²⁶.

A invasividade tumoral foi determinada histologicamente de acordo com estágios ^{27,28}: estágio 0 para tumores sem invasão estromal; estágio I para tumores com invasão estromal e estágio II para tumores com invasão de vasos linfáticos ou sanguíneos.

2.2 Imunohistoquímica

As amostras de neoplasias mamárias foram avaliadas por meio de imunohistoquímica quanto à expressão de RE, RP e HER2 para determinação do fenótipo triplo negativo. Os anticorpos utilizados e os procedimentos de recuperação antigênica adotados para cada anticorpo foram sumarizados na Tabela 1. A recuperação antigênica por calor foi realizada em panela de pressão por 20 minutos em tampão citrato pH 6 ^{2,28}, exceto para HER2, que se utilizou EDTA pH 9 em micro-ondas 720 W por 15 minutos ²⁹. Como controle negativo, o anticorpo primário foi substituído por soro albumina bovina (Amresco[®], 0332) (BSA) 1% em todos os ensaios. Como sistema de revelação utilizou-se anticorpo secundário biotilado e estreptavidina peroxidase (kit K069011 LSAB-Dako[®]). As lâminas foram lavadas com

solução PBS, entre cada etapa. A reação foi revelada com cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB K3468- Dako®) e as lâminas contracoradas com hematoxilina de Harris, desidratadas e montadas.

A expressão de RE e RP foi determinada por análise semi quantitativa de acordo com a frequência (número de células marcadas em 10 campos em objetiva de 40x). Foram consideradas positivas para RE, amostras com células epiteliais apresentando marcação nuclear em mais de 10% das células e negativas quando menos de 10% das células apresentaram marcação². Enquanto que para RP, as amostras foram positivas quando coloração nuclear foi observado em pelo menos 5% de células tumorais³⁰.

Para a análise da expressão de HER 2 foi determinada a partir da verificação da marcação da membrana das células epiteliais, conforme escore recomendado pelo HerceptTest™ (Dako). O escore +3 foi atribuído no caso de imunomarcção intensa, uniforme e completa de membrana plasmática em mais de 10% das células epiteliais da amostra tumoral. No escore +2 observou-se imunomarcção completa ou incompleta de membrana, em mais de 10% de células epiteliais neoplásicas. O escore +1 foi atribuído no caso de marcação fraca e incompleta de membrana plasmática, em pelo menos 10% de células epiteliais, e o escore 0 quando não houve marcação de membrana plasmática. Os tumores com escore +3 e +2 foram considerados positivos.

2.3 Acompanhamento e análise de sobrevida dos pacientes

Para determinação da sobrevida, as cadelas foram avaliadas quadrimestralmente até a data do óbito ou por um período mínimo de dois anos. Dados sobre o estado geral do paciente, ocorrência ou não de recidivas, surgimento de novos tumores em glândulas mamárias remanescentes ou ocorrência de metástases foram registrados. Foram necropsiadas aquelas que vieram a óbito no decorrer do estudo e foram voluntariamente encaminhadas pelos tutores ao Setor de Patologia Animal – UFU.

Realizou-se a avaliação do tempo de sobrevida global (SG), do intervalo livre de doença (ILD) e o tempo de desenvolvimento de tumor em mama remanescente (TDTMR). A ST foi definida como o tempo pós mastectomia até a data da morte; o ILD foi o tempo pós mastectomia até o desenvolvimento de recidiva ou metástase, e o TDTMR foi determinado como o tempo pós mastectomia até o surgimento de tumor em glândula mamária remanescente.

2.4 Análise Estatística

Na análise estatística, teste qui-quadrado foi utilizado para comparar as variáveis clinicopatológicas entre o grupo CMCTN e grupo não triplo negativo, com exceção da variável tipo histológico em que foi empregado Teste de Mann-Whitney. Neste caso, os carcinomas mamários foram

agrupados em carcinomas complexos e carcinomas simples (tubular, tubulopapilar, sólido) e foi excluído o tipo especial carcinosarcoma.

A curva de sobrevivência das cadelas foi estimada através do método de Kaplan Meier e o teste Log-Rank foi utilizado para comparar o tempo de SG de cadelas de tumores triplo negativos, além de intervalo livre de doença (ILD) e tempo de desenvolvimento de tumor em mama remanescente (TDTMR).

Na análise da SG foram censuradas cadelas que ainda estavam vivas ou que tiveram a causa do óbito não relacionada à neoplasia mamária ou indeterminada; para o ILD censurou-se cadelas que não tiveram recidivas ou metástase, e na avaliação do TDTMR foram censuradas cadelas submetidas à mastectomia total e os casos em que foi realizada mastectomia parcial sem ocorrência de tumor em glândula mamária remanescente até o final do estudo.

A comparação das variáveis preditoras para os CMC (idade, tamanho do tumor, localização, castração, TNM, tipo histológico, grau histológico, invasividade tumoral, amostras triplo negativo e não triplo negativo) com o tempo de SG foi realizada por meio de análise multivariada por regressão de Cox. Os testes foram realizados com o programa BioEstat 5.0³¹, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3 Resultados

A idade média das cadelas foi de $10,14 \pm 2,82$ anos, variando entre 4 e 17 anos e 84,53% (71/84) das cadelas apresentou idade igual ou superior a oito anos. Neste estudo, cadelas sem raça definida (SRD) corresponderam a 48,81% (41/84) dos animais, seguidas de cadelas da raça Poodle (14/84 – 16,67%) e Pinscher (6/84 – 7,14%). Apenas 3,57% (3/84) das cadelas foram castradas antes da remoção dos tumores mamários (Tabela 2).

O tamanho tumoral médio foi $4,62 \pm 3,61$ cm (0,5 – 21,5cm) e as glândulas inguinais (22/84 – 26,2%) foram frequentemente acometidas. Quanto a avaliação histológica das amostras, os carcinomas simples (38/84 – 45,24%) de grau II (37/84 – 44,04%) foram mais frequentes. A invasidade de vasos sanguíneos ou linfáticos foi evidenciada em 13/84 (15,48%) amostras e 34/84 (40,48%) linfonodos apresentaram metástases (Tabela 2).

De acordo com a imunexpressão de RE, RP e HER2, 21,43% (18/84) dos CMC foram classificadas como triplo negativo (TN) enquanto 78,57% (66/84) apresentaram positividade para pelo menos um destes três marcadores (Tabela 3) (Figura 1).

Nenhum dos parâmetros clinicopatológicos avaliados diferiram significativamente entre os dois grupos de CMC (triplo negativos e não triplo negativos), exceto pela castração (Tabela 4). Cadelas não castradas tiveram alto risco de desenvolvimento de CMCTN ($P=0,006$).

À análise multivariada entre a sobrevida global (SG) e as variáveis preditoras para CMC, observou-se correlação com castração ($p=0,012$), não sendo confirmada a correlação entre a sobrevida e CMCTN ($p=0,62$). Também não houve correlação entre as demais variáveis analisadas (Tabela 5).

Na análise da sobrevida de cadelas com CMCTN, 50% (9/18) morreram no período de 2 anos após mastectomia, com tempo médio de SG de $471,42 \pm 353,45$ dias ($15,71 \pm 11,78$ meses) (Figura 2A). No grupo de cadelas não triplo negativas 59,1% (39/66) morreram no período avaliado, com tempo médio de SG de $491,05 \pm 306,31$ dias ($16,37 \pm 10,21$ meses). Na comparação das curvas de sobrevida entre cadelas com CMCTN e não triplo negativas não houve diferença na SG ($P=0,49$) (Figura 2B).

Mastectomia total bilateral foi realizada em 26,19% (22/84) das cadelas, sendo que estas foram censuradas para análise de TDTMR. Mastectomia total unilateral foi realizada em 73,81% (62/84). Desenvolvimento de tumor em glândula mamária remanescente foi constatado em 29,03% (18/62) das cadelas que foram submetidas à mastectomia total unilateral. Recidiva local ocorreu em 3,57% (3/84) das cadelas e metástase à distância foi observada em 40,47% (34/84). Todas as cadelas (3/84) que tiveram recidiva local também apresentaram desenvolvimento posterior de metástase à distância.

O tempo de desenvolvimento de tumor em mama remanescente (TDTMR) no grupo de cadelas com CMCTN foi de $141,33 \pm 97,91$ dias ($4,71 \pm 3,26$ meses). O TDTMR do grupo não triplo negativo foi de $305,63 \pm 339,62$ ($10,19 \pm 11,32$ meses). O intervalo livre de doença (ILD) foi de $121 \pm 89,69$ dias ($4,03 \pm 2,99$ meses) no grupo de cadelas com CMCTN. O ILD do grupo não triplo negativo foi de $252,06 \pm 248,37$ ($8,40 \pm 8,28$ meses).

As metástases foram a causa da morte de 36,91% (31/84) das cadelas com TMC, sendo o principal sítio os pulmões (70,97% - 22/31), seguido o fígado (29,03% - 9/31), linfonodo inguinal (12,90% - 4/31) e por fim, outros focos como cavidade abdominal (3,22% - 1/31) e baço (3,22% - 1/31). A recidiva local e metástases ocorreram concomitantemente em 22,22% (4/18) das cadelas com CMCTN enquanto que nas cadelas não triplo negativas, 46,97% (31/66) apresentaram recidiva local e metástase.

Não houve diferença entre o ILD de cadelas com CMCTN e cadelas não triplo negativas ($p=0,08$) (Figura 4B). Desenvolvimento de tumor em glândula mamária remanescente ocorreu em 16,67% (3/18) das cadelas com CMCTN e em 24,24% (16/66) das cadelas não triplo negativas. Do mesmo modo, não houve diferença no TDTMR entre cadelas com CMCTN e cadelas não triplo negativas ($P=0,18$) (Figura 3).

4 Discussão

Na cadela, estudos sobre tumores TN são recentes e escassos. Neste estudo, 21,43% das amostras de CMC foram TN. Frequências de CMCTN semelhantes foram relatadas (15,5%¹⁵, 18,7%³) e, na mulher, tumores TN representam 10 a 17% das neoplasias mamárias¹⁰⁻¹². Outros estudos em cadelas, relataram frequências maiores (55%³² e 76,3%¹⁶) e vários fatores podem ter contribuído para

esta discrepância, como variação no critério de inclusão no estudo ¹⁶ e metodologia empregada, como uso de diferentes clones de anticorpos ^{16,33}, determinação de limiar de positividade, ou seja, *cut off* para marcação de RE e RP ¹⁵ e falta de padronização de técnicas de imunohistoquímica na cadela ^{16,34}.

Em cadelas, receptores hormonais e HER2 são importantes marcadores moleculares utilizados na determinação de prognóstico ^{2,28,29}. Apesar da expressão gênica ser considerada “padrão ouro” para a caracterização molecular do tumor de mama, esta tecnologia ainda é pouco utilizada ³⁵ em Medicina Veterinária devido ao custo elevado, uso de equipamentos sofisticados e necessidade de pessoal treinado. Por estes motivos, a técnica de imunohistoquímica é amplamente utilizada, pois a expressão molecular corresponde e correlaciona-se com a expressão gênica no câncer de mama ^{22,36}.

Tumores TN acomete mulheres na pré menopausa ^{13,14}, enquanto na cadela, acomete animais com mais de oito anos e não castradas ^{2,3,15,16}. Neste estudo a média de idade das cadelas foi de 10 anos e não houve correlação entre idade e frequência de tumores TN, assim como relatado por outros autores que não identificaram relação entre idade e tumores que não expressaram RE, PR e HER2 ^{2,3}.

No caso de CMC em geral, a cada ano de vida adicional há aumento da taxa de risco de desenvolvimento de tumor de mama em 23% e a idade avançada está relacionada a menor sobrevida e pior prognóstico ⁷. Além disso, a idade está relacionada com expressão de receptores hormonais, sendo que cadelas velhas apresentam negatividade para RE ^{2,28,37-39} e RP ²⁸ e maior marcação de Ki67 ².

Dentre as variáveis clinicopatológicas estudadas, na análise univariada, aquela que apresentou relação com a frequência de CMCTN foi a castração. A importância da castração como método de prevenção de neoplasias mamárias já está bem estabelecida ^{40,41}. Cadelas castradas antes do primeiro cio, reduzem 99,95% as chances de desenvolvimento tumoral ⁴², pois o desenvolvimento tumoral é altamente promovido pela presença de estrógeno e progesterona nesta espécie ⁴⁰.

Nas cadelas com CMCTN do presente estudo, 94,45% não eram castradas e são escassos os estudos que correlacionam especificamente a castração com CMCTN. Gama et al (2008) ² identificaram 20,59% de cadelas intactas com CMC e, destas, 80,95% não expressaram RE, RP e HER2. Assim como no presente estudo, estes autores verificaram a relação entre ausência de expressão destes receptores e castração.

Neste estudo, CMCTN menores que três centímetros foram mais frequentes (50%). O tamanho tumoral é considerado um fator de prognóstico para cadelas ^{5,6} além de ter relação com a sobrevida em cadelas com CMC ^{7,43}. Tumores triplo negativos são frequentemente maiores que três centímetros ^{2,32} e estão associados a pior prognóstico e menor sobrevida ^{2,3,17,29}. Porém no presente estudo, na análise multivariada de Cox, o tamanho das neoplasias mamárias não apresentou relação com a sobrevida (P= 0,70). Gama et al. (2008)² também não verificaram associação entre tamanho tumoral e tipos moleculares de CMC. Este resultado pode ter sido influenciado pela população canina estudada, pois

percebe-se que atualmente os tutores detectam precocemente aumento de volume nas mamas de suas cadelas e procuram atendimento profissional rapidamente.

Quanto ao estadiamento, 61,11% das cadelas com CMCTN receberam estadiamento clínico I, II e III. Varallo (2016)¹⁷ identificou 47% das cadelas com CMCTN estadiadas em I e II e Gama et al. (2008)² não verificaram associação entre estadio e tipo molecular de CMC. Estádios IV e V foram atribuídos a 38,89% das cadelas com CMCTN. Metástase em linfonodo é considerado um potente fator de prognóstico que interfere na sobrevida global e intervalo livre da doença em cadelas com CMCTN¹⁶. A dificuldade de diagnóstico de metástases em linfonodos pela coloração de hematoxilina-eosina pode ter influenciado na não identificação de cadelas com CMCTN com metástases. Estudo recente indicou que no caso de metástases de CMC em linfonodos, a maioria das células metastáticas ocupam um tamanho menor que 0,2mm e são consideradas células tumorais isoladas^{44,45}. Além disso, a qualidade do corte histológico e o treinamento do patologista podem interferir na leitura das lâminas³⁴.

Das cadelas com CMCTN, 22,22% (4/18) morreram em decorrência de metástase de carcinoma mamário, sendo que 50% destas cadelas apresentaram carcinoma simples de alto grau histológico. As metástases estavam localizadas em pulmões (75% - 3/4) e cavidade abdominal (25% - 1/4). Cintra (2015)³² verificou 18% de óbitos em cadelas com CMCTN com neoplasias grau II e III. Na mulher são relatadas taxas de óbitos maiores, de 37%³² e 42,6%⁴⁶, indicando que mulheres com o fenótipo TN tem maior probabilidade de vir a óbito que as cadelas com o mesmo fenótipo³².

No presente estudo, dentre os CMCTN, carcinoma complexo e de grau I e II foram identificados com maior frequência e não houve correlação do tipo histológico (P=0,33) e grau (P=0,57) com o prognóstico de cadelas. Outros autores também verificaram maior frequência de CMCTN do tipo carcinoma complexo quando comparados com carcinoma simples (tubular e tubulopapilar)^{17,28}. Ainda, Kim et al (2016)¹⁵ verificaram que os tipos histológicos mais frequentes dentre CMCTN foram carcinomas complexos e carcinomas em tumor misto de grau I. Outros estudos indicaram que CMCTN apresentam grau III com maior frequência^{2,3}. Sassi et al (2010)²⁸ não identificaram correlação entre tipo e grau histológico com sobrevida nos CMC que apresentaram negatividade para RE, RP e HER2, assim como no presente estudo.

A invasividade tumoral é uma característica pouco avaliada no CMCTN. Nos achados deste trabalho, não houve correlação entre invasividade e CMCTN, diferindo de Gama et al (2008)² que verificaram alta correlação entre invasividade de vasos e nos CMC que apresentaram negatividade para RE, RP e HER2. Porém, a maioria dos CMCTN do presente estudo, apresentaram invasividade, sendo que 50% apresentaram invasão estromal (escore 1) e 22,22% invasão de vasos sanguíneos e linfáticos (escore 2). Sassi et al (2010)²⁸, assim como no presente trabalho, não verificaram correlação da invasividade com os tipos moleculares nos CMC, porém também verificaram escore 1 de invasividade com maior frequência nos CMCTN.

Na mulher, tumores TN são agressivos, apresentam recorrência em um ou três anos e redução da sobrevida em 10 anos quando comparado a outros tipos moleculares tumorais; e morte nos primeiros cinco anos após terapia ^{19,47}. O comportamento agressivo dos CMCTN também é identificado. Metástases são identificadas frequentemente em linfonodos ^{2,16}, pele, pulmão e fígado ¹⁷, imunomarcagem positiva para Ki67 ¹⁶, além de recidivas e morte em 272 dias (9 meses) após o diagnóstico ¹⁷.

Na análise multivariada foi utilizado o modelo de riscos proporcionais de Cox, que é uma análise de regressão múltipla aplicado na análise de sobrevida e indicado quando se deseja estimar o papel de variáveis independentes que agem multiplicativamente sobre o risco ⁴⁸. Assim como na análise univariada, com exceção da variável castração, não foi identificada influência das variáveis estudadas na sobrevida. Estudos que avaliaram o desenvolvimento de CMC e a expressão de RE e RP em cadelas, verificaram a maior frequência de neoplasias em cadelas intactas ^{16,38,49,50} com negatividade para RE e RP e prognóstico desfavorável ³⁸, redução de sobrevida ⁵⁰ e menor tempo livre da doença ³⁸.

A SG de cadelas com CMCTN não diferiu da SG de cadelas não TN e foi de 471,42±353,45 dias, sendo maior quando comparado a relatos prévios: 274 ¹⁷ e 277,5±170,1 dias ³². Ainda, Gama et al (2008) ² relataram tempo de sobrevida menor que 15 meses para cadelas com CMC com negatividade para RE, RP e HER2.

Com relação ao ILD e TDTMR, não houve diferença nestes períodos entre cadelas com CMCTN e não triplo negativas. Menor SG foi relatada em cadelas portadoras de tumores negativas para RE, RP e HER2, quando comparadas com outros tipos moleculares ² e não há estudos sobre a influência de CMCTN no TDTMR. Diferentemente dos resultados observados nas cadelas deste estudo, na mulher, o desenvolvimento de tumor em mama contralateral (CBC) e em mama remanescente ipsilateral (IBTR) estão relacionados com ausência de expressão de RE, RP e HER2 ^{51,52} (ARVOLD et al., 2011; CORSO et al., 2018). Por outro lado, Corso et al (2018) ⁵², também verificaram que, apesar da SG diminuir em mulheres com IBTR e CBC, não houve correlação entre SG e IBTR e CBC.

Melhor prognóstico, maior sobrevida e intervalo livre de doença e menor risco de morte é relatado em cadelas com tumores que expressam receptores hormonais e não expressam HER2 ^{2,16}. Em estudos que realizaram a classificação molecular de carcinomas mamários caninos verificaram que a sobrevida, risco de morte, desenvolvimento de metástases e recidivas são diretamente relacionados primeiramente com a expressão de RE e/ou RP, em seguida HER2 ^{2,3,16,29} e por fim com marcadores basais: citoqueratinas (CK5/6, CK14), fator de crescimento epidérmico tipo 1 (EGFR), p57, p63, Ki67, p-caderina ^{2,16,29,53,54}.

Assim como no tumor de mama na mulher, o fenótipo triplo negativo ocorre em cadelas portadoras de carcinomas mamários. Porém o comportamento dos CMCTN parece ser de menor agressividade quando comparado com a mulher. A utilização de outros marcadores moleculares e os

subtipos histológicos podem auxiliar na diferenciação de subgrupos moleculares dentro do fenótipo triplo negativo e levar à identificação de fenótipos triplo negativos mais ou menos agressivos. Assim como ocorre com CMC em geral, a castração pode influenciar na ocorrência de CMCTN.

Referências

1. Misdorp M. Tumours of the mammary gland. In: *Tumors in Domestic Animals*. 4^a. Iowa States California: Blackwell Publishing Company; 2002:575-606.
<https://doi.org/10.1002/9780470376928.ch12>
2. 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(2):123-132. doi:10.1007/s00428-008-0644-3 <https://doi.org/10.1007/s00428-008-0644-3>
3. Kim NH, Lim HY, Im KS, Kim JH, Sur J-H. Identification of triple-negative and basal-like canine mammary carcinomas using four basal markers. *J Comp Pathol*. 2013;148(4):298-306. doi:10.1016/j.jcpa.2012.08.009 <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2012.08.009>
4. Tang P, Wang J, Bourne P. Molecular classifications of breast carcinoma with similar terminology and different definitions: are they the same? *Hum Pathol*. 2008;39(4):506-513. doi:10.1016/j.humpath.2007.09.005 <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2007.09.005>
5. Cassali GD, Lavallo GE, Nardi ABD, et al. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*. 2011;4(2):153-180.
6. Sorenmo K. Canine mammary gland tumors. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*. 2003;33(3):573-596. doi:10.1016/S0195-5616(03)00020-2 [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(03\)00020-2](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(03)00020-2)
7. Dias ML de M, Andrade JML, Castro MB de, et al. Survival analysis of female dogs with mammary tumors after mastectomy: epidemiological, clinical and morphological aspects. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2016;36(3):181-186. doi:10.1590/S0100-736X2016000300006 <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016000300006>
8. 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. doi:10.1177/0300985817698208 <https://doi.org/10.1177/0300985817698208>
9. Rakha EA, Ellis IO. Triple-negative/basal-like breast cancer: review. *Pathology*. 2009;41(1):40-47. doi:10.1080/00313020802563510 <https://doi.org/10.1080/00313020802563510>
10. Reis-Filho JS, Tutt ANJ. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology*. 2008;52(1):108-118. doi:10.1111/j.1365-2559.2007.02889.x <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2007.02889.x>
11. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer*. 2007;109(9):1721-1728. doi:10.1002/cncr.22618 <https://doi.org/10.1002/cncr.22618>
12. Palma G, Frasci G, Chirico A, et al. Triple negative breast cancer: looking for the missing link between biology and treatments. *Oncotarget*. 2015;6(29):26560-26574. doi:10.18632/oncotarget.5306 <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5306>
13. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AHS, Robertson JF, Ellis IO. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer*. 2007;109(1):25-32. doi:10.1002/cncr.22381 <https://doi.org/10.1002/cncr.22381>

14. Yang XR, Sherman ME, Rimm DL, et al. Differences in risk factors for breast cancer molecular subtypes in a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16(3):439-443. doi:10.1158/1055-9965.EPI-06-0806 <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0806>
15. Kim H-W, Lim H-Y, Shin J-I, Seung B-J, Ju J-H, Sur J-H. Breed- and age-related differences in canine mammary tumors. *Can J Vet Res.* 2016;80(2):146-155.
16. Abadie J, Nguyen F, Loussouarn D, et al. Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 2: immunophenotypes and prognostic significance. *Breast Cancer Res Treat.* 2018;167(2):459-468. doi:10.1007/s10549-017-4542-8 <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4542-8>
17. Varallo GR [UNESP. Classificação fenotípica prognóstica para neoplasmas mamários em cadelas. *Prognostic phenotypic classification for mammary tumors in bitches.* November 2016. <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/147056>. Accessed March 19, 2019.
18. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res.* 2007;13(8):2329-2334. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1109 <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1109>
19. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res.* 2007;13(15 Pt 1):4429-4434. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-3045 <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-3045>
20. Haffty BG, Yang Q, Reiss M, et al. Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. *J Clin Oncol.* 2006;24(36):5652-5657. doi:10.1200/JCO.2006.06.5664 <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.06.5664>
21. Kreike B, van Kouwenhove M, Horlings H, et al. Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Res.* 2007;9(5):R65. doi:10.1186/bcr1771 <https://doi.org/10.1186/bcr1771>
22. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406(6797):747-752. doi:10.1038/35021093 <https://doi.org/10.1038/35021093>
23. Owen LN. TNM Classification of Tumours in Domestic Animals/ edited by L.N. Owen. 1980:52.
24. Goldschmidt MH, Peña L, Zappulli V. Tumours of th mammary gland. In: *Tumors in domestic animals.* 5^a. New Jersey: Wiley-Blackwell; 2017:723-765. <https://doi.org/10.1002/9781119181200.ch17>
25. 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. *Histopathology.* 1991;19(5):403-410. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x>
26. Sorenmo KU, DEANNA RW, Goldschmidt RH. Tumors of the mammary gland. In: *Small Animal Clinical Oncology.* 5^a. Philadelphia: Saunders; 2013:553 – 571. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-2362-5.00027-X>
27. Gilbertson SR, Kurzman ID, Zachrau RE, Hurvitz AI, Black MM. Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Vet Pathol.* 1983;20(2):127-142. doi:10.1177/030098588302000201 <https://doi.org/10.1177/030098588302000201>

28. 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. doi:10.1186/1746-6148-6-5 <https://doi.org/10.1186/1746-6148-6-5>
29. Im KS, Kim NH, Lim HY, Kim HW, Shin JI, Sur JH. Analysis of a new histological and molecular-based classification of canine mammary neoplasia. *Vet Pathol*. 2014;51(3):549-559. doi:10.1177/0300985813498780 <https://doi.org/10.1177/0300985813498780>
30. 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(3):225-232. doi:10.1016/j.rvsc.2005.02.002 <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.02.002>
31. Ayres M, Ayres Júnior M, Ayres DL, Santos AAS. *BioEstat: Aplicações Estatísticas Nas Áreas Das Ciências Bio-Médicas*. versão 5.0.; 2007.
32. Cintra PP. Comparações das imunomarcações de células-tronco tumorais (cd44+/cd24-) em tumores mamários triplo negativos em cadelas e mulheres. https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=2216508. Published 2015. Accessed April 2, 2019.
33. 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. *Journal of Comparative Pathology*. 2014;151(1):42-50. doi:10.1016/j.jcpa.2014.04.001 <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2014.04.001>
34. 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. doi:10.1177/0300985813509388 <https://doi.org/10.1177/0300985813509388>
35. Rakha EA, El-Sayed ME, Reis-Filho J, Ellis IO. Patho-biological aspects of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;113(3):411-422. doi:10.1007/s10549-008-9952-1 <https://doi.org/10.1007/s10549-008-9952-1>
36. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(19):10869-10874. doi:10.1073/pnas.191367098 <https://doi.org/10.1073/pnas.191367098>
37. 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. doi:10.2460/javma.235.4.391 <https://doi.org/10.2460/javma.235.4.391>
38. de Las Mulas JM, Millán 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(2):200-212. doi:10.1354/vp.42-2-200 <https://doi.org/10.1354/vp.42-2-200>
39. Nieto A, Peña L, Pérez-Alenza MD, Sánchez MA, Flores JM, Castaño M. Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Vet Pathol*. 2000;37(3):239-247. doi:10.1354/vp.37-3-239 <https://doi.org/10.1354/vp.37-3-239>

40. Sorenmo KU, Shofer FS, Goldschmidt MH. Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. *J Vet Intern Med.* 2000;14(3):266-270. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2000.tb01165.x>
41. Fonseca CS, Daleck CR. Neoplasias mamárias em cadelas: influência hormonal e efeitos da ovariário-histerectomia como terapia adjuvante. *Ciência Rural.* 2000;30(4):731-735. doi:10.1590/S0103-84782000000400030 <https://doi.org/10.1590/S0103-84782000000400030>
42. Schneider R, Dorn CR, Taylor DO. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *J Natl Cancer Inst.* 1969;43(6):1249-1261.
43. Toríbio JM de ML, Lima AE, Martins Filho EF [UNESP, et al. Caracterização clínica, diagnóstico histopatológico e distribuição geográfica das neoplasias mamárias em cadelas de Salvador, Bahia. *Clinical characterization, histopathologic diagnosis and geoprocessing of mammary tumours in bitches from the city of Salvador, Bahia State.* December 2012:427-433. doi:10.1590/S0034-737X2012000400001 <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2012000400001>
44. 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. *Journal of Comparative Pathology.* 2018;158:32-38. doi:10.1016/j.jcpa.2017.11.001 <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2017.11.001>
45. Cassali GD, Lavallo GE, Ferreira E, et al. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors - 2013. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology.* 2014;7(2):38-69.
46. De Brot M, Soares FA, Stiepcich MMÁ, Cúrcio VS, Gobbi H. Basal-like breast cancers: clinicopathological features and outcome. *Revista da Associação Médica Brasileira.* 2009;55(5):529-534. doi:10.1590/S0104-42302009000500014 <https://doi.org/10.1590/S0104-42302009000500014>
47. Lin NU, Vanderplas A, Hughes ME, et al. Clinicopathologic features, patterns of recurrence, and survival among women with triple-negative breast cancer in the National Comprehensive Cancer Network. *Cancer.* 2012;118(22):5463-5472. doi:10.1002/cncr.27581 <https://doi.org/10.1002/cncr.27581>
48. Kleinbaum DG, Klein M. *Survival Analysis: A Self-Learning Text.* 3a ed. New York: Springer; 2015.
49. 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.* 2018;167(3):635-648. doi:10.1007/s10549-017-4548-2 <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4548-2>
50. 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(1):62-68. doi:10.1016/j.tvjl.2014.06.003 <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.06.003>
51. Arvold ND, Taghian AG, Niemierko A, Abi Raad RF, Sreedhara M, Nguyen PL, Bellon JR, Wong JS, Smith BL, Harris JR. Age, breast cancer subtype approximation, and local recurrence after breast-conserving therapy. *J. Clin. Oncol.* 2011;29(29):3885-3891. doi:10.1200/JCO.2011.36.1105 <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.36.1105>
52. Corso G, Maisonneuve P, Santomauro GI, De Scalzi AM, Toesca A, Bassi FD, Farante G, Caldarella P, Intra M, Galimberti V, Veronesi P. Ipsilateral breast tumor reappearance and contralateral breast cancer after primary breast cancer treatment: a comprehensive retrospective study of 15,168 patients. *Oncology.* 2018;95(3):147-155. doi:10.1159/000488764 <https://doi.org/10.1159/000488764>

53. Matos I, Dufloth R, Alvarenga M, Zeferino LC, Schmitt F. p63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. *Virchows Arch*. 2005;447(4):688-694. doi:10.1007/s00428-005-0010-7 <https://doi.org/10.1007/s00428-005-0010-7>
54. Kim M-J, Ro JY, Ahn S-H, Kim HH, Kim S-B, Gong G. Clinicopathologic significance of the basal-like subtype of breast cancer: a comparison with hormone receptor and Her2/neu-overexpressing phenotypes. *Hum Pathol*. 2006;37(9):1217-1226. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2006.04.015>

Tabela 1: Anticorpos primários, origem e protocolos de imunohistoquímica

Anticorpo	Origem	Clone	Diluição	Controle positivo	Incubação
RE	Santa Cruz, EUA	H-184	1:200	Útero de cadela	overnight 4°C
RP	Abcam, EUA	ab191138	1:400	Útero de cadela	overnight 4°C
HER2	Dako, Denmark	A0485	1:400	Carcinoma mamário canino	overnight 4°C

Tabela 2. Aspectos clinicopatológicos e tumorais de cadelas com neoplasia mamária

Características	n (%)
Idade	
< 8 anos	13 (15,47%)
≥ 8 anos	71 (84,53%)
Ovarioestectomia	
Sim	3 (3,57%)
Não	81 (96,43%)
Raça	
SRD	41 (48,81%)
Poodle	14 (16,67%)
Pinscher	6 (7,14%)
Yorkshire	5 (5,96%)
Dachshund	4 (4,76%)
Basset	3 (3,57%)
Pit Bull	3 (3,57%)
Cocker	2 (2,38%)
Shitzu	2 (2,38%)
Outras	4 (4,76%)
Tamanho tumoral	
T1 (< 3 cm)	34 (40,47%)
T2 (3 a 5 cm)	21 (25%)
T3 (> 5 cm)	29 (34,53%)
Localização	
Torácicas	12 (14,28%)
Abdominais	11 (13,09%)
Inguinais	22 (26,20%)
Múltipla (mais de uma glândula)	39 (46,43%)
Carcinomas	
Carcinomas simples	
Carcinoma tubulopapilar	29 (34,52%)
Carcinoma sólido	11 (13,10%)
Carcinoma tubular	4 (4,76%)
Carcinoma em tumor misto	1 (1,19%)
Carcinoma complexo	38 (45,24%)
Carcinossarcoma	1 (1,19%)
Grau histológico	
I	35 (41,67%)
II	37 (44,04%)
III	12 (14,29%)
TNM	
I	25 (29,77%)
II	13 (15,48%)
III	12 (14,28%)
IV	26 (30,95%)
V	8 (9,52%)
Invasividade	
0	27 (32,14%)
I	44 (52,38%)
II	13 (15,48%)

Tabela 3: Imunoexpressão de receptores de estrógeno, progesterona e fator de crescimento epidérmico humano 2

Marcador molecular	positivo n (%)	negativo n (%)
RE	26 (30,95%)	58 (69,05%)
RP	54 (64,29%)	30 (35,71%)
HER2	15 (17,86%)	69 (82,14%)

Tabela 4. Características clinicopatológicas de carcinomas mamários triplo negativos e não triplo negativos de cadelas

	Triplo negativo n= 18 n (%)	Não triplo negativo n=66 n(%)	P[¶]
Idade			0,20
<8anos	5 (27,78%)	8 (12,12%)	
≥8anos	13 (72,22%)	58 (87,88%)	
Tamanho tumoral			0,19
T1 (<3cm)	9 (50%)	25 (37,88%)	
T2 (3 a 5cm)	6 (33,33%)	15 (22,72%)	
T3 (>5cm)	3 (16,67%)	26 (39,40%)	
Localização tumoral			0,70
torácicas	4 (22,22%)	8 (12,12%)	
abdominais	2 (11,11%)	9 (13,64%)	
inguinais	5 (27,78%)	17 (25,76%)	
múltipla	7 (38,89%)	32 (48,48%)	
Ovarioestectomia			0,006*
não	17 (94,45%)	64 (96,97%)	
sim	1 (5,55%)	2 (3,03%)	
Tipo histológico			0,28†
Complexo	11 (61,11%)	28 (45,46%)	
Simples	7 (38,89%)	37 (53,03%)‡	
Grau histológico			0,90
I	8 (44,45%)	27 (40,90%)	
II	8 (44,45%)	29 (43,94%)	
III	2 (11,10%)	10 (15,16%)	
TNM			0,90
I, II, III	11 (61,11%)	39 (59,09%)	
IV, V	7 (38,89%)	27 (40,91%)	
Invasividade			0,65
0	5 (27,78%)	22 (33,33%)	
I	9 (50%)	35 (53,03%)	
II	4 (22,22%)	9 (13,64%)	

¶teste de Qui-quadrado; * alta correlação; †teste de Mann Whitney; ‡ 83 amostras avaliadas.

Tabela 5. Regressão multivariada de Cox com risco relativo e intervalo de confiança de 95% para variáveis preditoras e sobrevida global de cadelas com carcinoma mamário TN.

Variáveis preditoras	Erro padrão	P-valor	Taxa de risco	IC 95%
Tripla Negativo	0,534	0,6199	0,7673	0.2694 - 2.1854
Tamanho Tumoral	0,3297	0,7075	0,8837	0.4631 - 1.6862
TNM	0,1904	0,4603	1,1509	0.7924 - 1.6716
Tipo Histológico	0,1687	0,9	0,979	0.7033 - 1.3628
Grau Histológico	0,3161	0,5828	0,8406	0.4524 - 1.5618
Invasividade	0,3241	0,8561	1,0605	0.5619 - 2.0015
Castração	1,0513	0,0128 *	13,6757	1.7420 - 107.3645
Idade	0,0852	0,5976	1,046	0.8852 - 1.2360
Localização	0,2083	0,9505	0,9872	0.6563 - 1.4848

* P< 0,05 é considerado significante

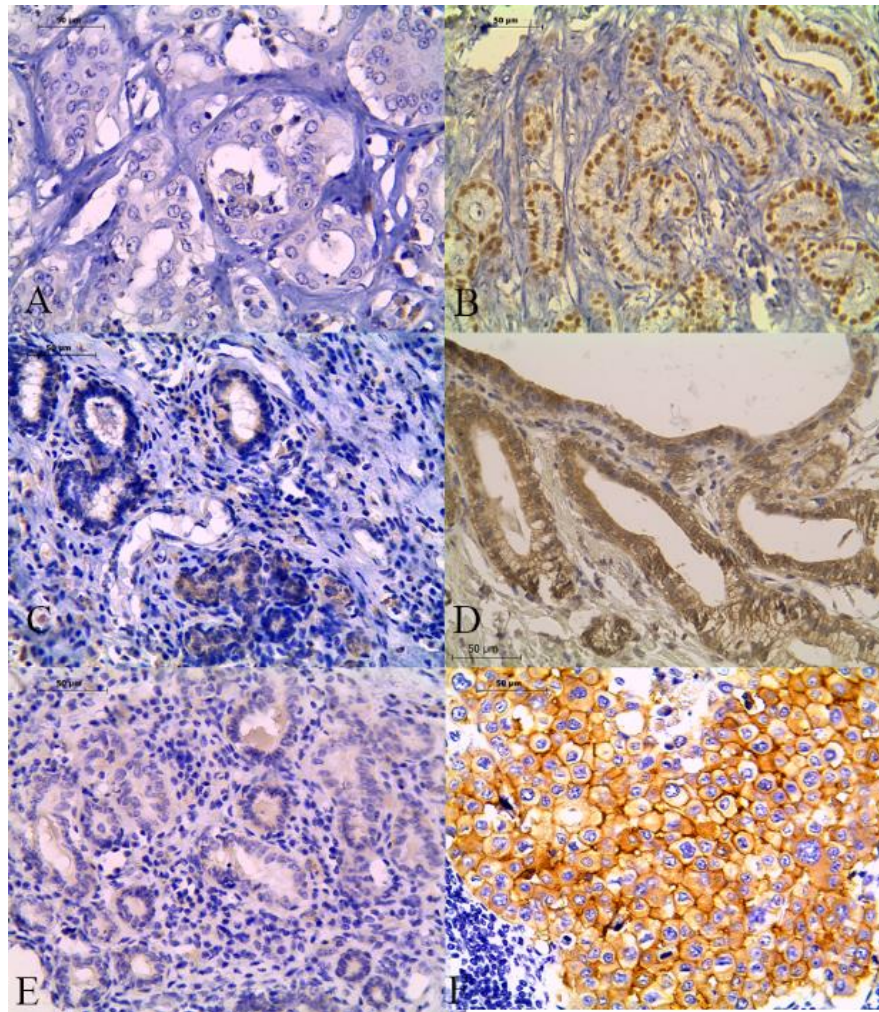
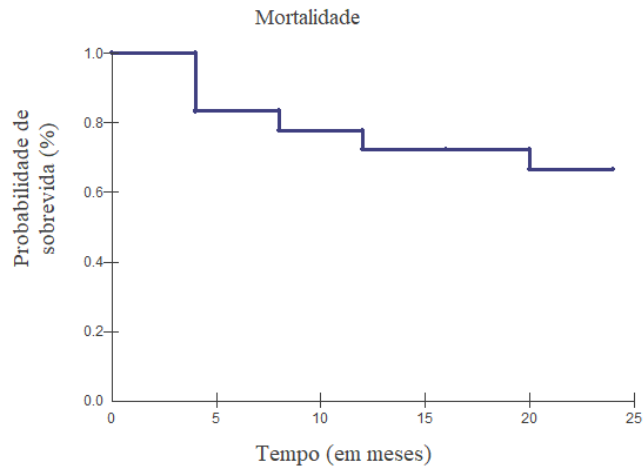


Figura 1. Fotomicrografias de carcinomas mamários caninos triplo negativos, imunohistoquímica (IHQ), 400x, 50 µm. (A) Carcinoma complexo com ausência de imunopressão de receptores de estrógeno em células epiteliais neoplásicas; (C) Carcinoma complexo com ausência de imunopressão para progesterona em células epiteliais neoplásicas; e (E) Carcinoma complexo com ausência de imunomarcção para HER2 em membrana plasmática de células epiteliais neoplásicas. Fotomicrografias de controles positivos de IHQ, 400x, 50 µm. (B) Útero de cadela com núcleos de células epitelial glandulares imunomarcadas para receptores de estrógeno; (D) Útero de cadela com imunomarcção nuclear para progesterona em células epitelial glandulares; e (F) Células epiteliais de carcinoma mamário de cadela com imunopressão de HER2. Contracoloração com Hematoxilina de Harris.

Figura 2. Curva Kaplan Meier do tempo de sobrevida global de cadelas com tumores triplo negativo (A). Curvas de sobrevida global de cadelas com tumores triplo negativos e de cadelas com tumores não triplo negativos, com comparação das curvas pelo teste de Log-Rank (B).

A



B

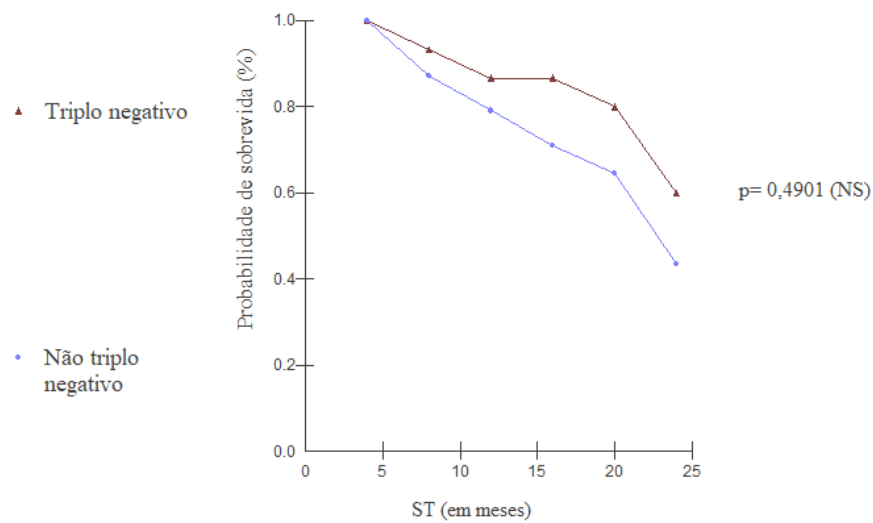
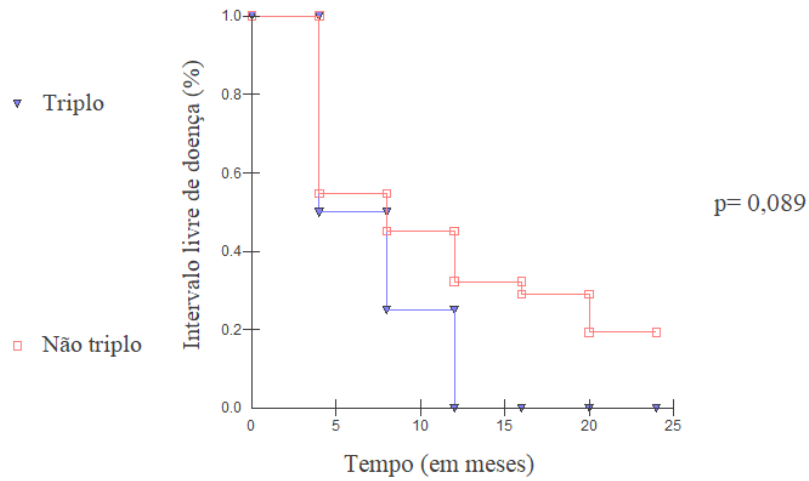


Figura 3. Curvas de sobrevida Kaplan-Meier para cadelas com carcinomas mamários triplo negativos e cadelas com carcinomas mamários não triplo negativos e análise pelo teste Log-Rank. A) Intervalo livre de doença (P=0,08); B) Tempo de desenvolvimento de tumor em mama remanescente (P=0,18). NS= não significativo.

A



B

