TATIANA CRISTINA SILVA

**Análise dos tipos histológicos do câncer de mama em cadelas e sua
correlação com o perfil de expressão de proteínas associadas ao
prognóstico**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas
Área de Concentração: Distúrbios
do Crescimento Celular,
Hemodinâmicos e da Hemostasia

Orientadora: Profª. Dra. Juliana
Pereira

São Paulo

2018

TATIANA CRISTINA SILVA

**Análise dos tipos histológicos do câncer de mama em cadelas e sua
correlação com o perfil de expressão de proteínas associadas ao
prognóstico**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas
Área de Concentração: Distúrbios
do Crescimento Celular,
Hemodinâmicos e da Hemostasia

Orientadora: Profª. Dra. Juliana
Pereira

São Paulo

2018

*Aos meus pais, Nilton e Sônia, por
todo amor e crença que dispenderam a mim.*

*Ao meu pai, especial gratidão pela força,
por me incentivar a seguir em frente
apesar dos maiores desafios.*

*À minha mãe, gratidão pelas mãos delicadas,
pelas palavras de conforto adoçadas com bolo
de fubá e café e pelas longas conversas
que sempre me fortaleceram.*

*Ao meu marido e companheiro Alan
por ter sido o equilíbrio e a bondade que
deram condições de evoluir na conclusão deste trabalho,
por sempre acreditar e confiar em mim e
por lutar ombro-a-ombro pela realização de meus sonhos.*

Aos meus amados avós, Serafim e Ivone (in memoriam)
pelas lições de humildade,
por me mostrarem que a força de vontade é o
único substrato necessário para a realização dos sonhos,
pela infância feliz e por me mostrarem que
o valor mais precioso desta vida é o que deixamos
nos coração de quem amamos.

*À todos os pacientes envolvidos neste trabalho,
que enfrentaram as dores do câncer.
À vocês dedico este estudo na esperança de que
a ciência possa revelar a cada dia uma forma
melhor de aliviar os sofrimentos gerados por esta doença.*

AGRADECIMENTOS

A gratidão é o reconhecimento da participação do outro na construção de nosso ser e é neste contexto que gostaria de agradecer a todos que contribuíram para a finalização desta etapa importante para a minha formação profissional. Em especial:

A Deus por ter me dado capacidade de superar limites, por ter aberto minha mente a todo o conhecimento recebido, por ter me dado forças nos momentos mais exaustivos e por ter colocado em meu caminho todas as pessoas que tornaram este processo mais doce e suave.

À Professora Doutora Juliana Pereira pela orientação, disponibilidade e rica oportunidade de aprendizado.

Aos patologistas Thaís Rosalen Fernandes, Osimar de Carvalho Sanches, Felipe Sueiro pelo auxílio nas análises e resultados deste trabalho.

À equipe de colaboradores do Centro de Diagnósticos PROVET, Beatriz Ferreira, Suelen Santiago, Julia Christina Castro Cruz e à equipe de colaboradores e médicos veterinários do Centro Veterinário Scienza Animali, Vanessa Pincelli, Amanda Cordeiro, Rayra Salério e Nathália Barbieri por terem sido meus braços direito e esquerdo permitindo que eu pudesse me dedicar a esta pesquisa.

Ao laboratório PROVET pela concessão das amostras que permitiram este estudo.

A todos os professores do ICESP por terem me ensinado a complexidade da abordagem do paciente oncológico. Nos corredores do ICESP conheci uma nobre e especial medicina, que aborda a doença com o objetivo de valorizar a vida e o bem estar físico e emocional dos pacientes.

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

A:	Ausente
COX:	Cicloxygenase
HE:	Eosina-hematoxilina
HER-2:	Receptor do fator de crescimento epidérmico humano do tipo 2
IHQ:	Imuno-histoquímica
IC:	Intervalo de confiança
n:	Número amostral
PCNA:	Antígeno nuclear de proliferação celular
SMA:	Actina de músculo liso
TMA:	<i>Tissue Microarray</i>

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática da drenagem linfática das glândulas mamárias torácicas craniais e caudais (a), das glândulas craniais abdominais (b), das caudais abdominais (c) e das inguinais (d). Na imagem são representadas as glândulas mamárias torácicas craniais (1), torácicas caudais (2), abdominais craniais (3), abdominais caudais (4) e inguinais (5), linfonodos axilares (ax), linfonodos esternais (st), linfonodos ilíacos mediais (mi), linfonodos inguinais superficiais (in) e os linfonodos poplíteos (pl) (Patsikas e Dessiris, 2006)	30
Figura 2 -	Exemplos de porcentagem de marcação de Ki-67 elevada (A), intermediária (B) e baixa (C).....	56
Figura 3 -	Exemplos de porcentagem de marcação de HER-2 positiva (A) e negativa (B).....	56
Figura 4 -	Exemplos de porcentagem de marcação de COX-2 elevada (A), intermediária (B) e ausente (C).....	57
Figura 5 -	Exemplos de porcentagem de marcação de p63 positiva nas células tumorais (A) e negativa nas células tumorais, sendo positiva apenas nas células da camada basal (B).....	57
Figura 6 -	Exemplos de porcentagem de marcação de vimentina elevada (A), intermediária (B) e baixa (C).....	58
Figura 7 -	Exemplos de porcentagem de marcação de e-caderina positiva (A) e negativa (B).....	58

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Sumário de graduação histopatológica do carcinoma mamário de acordo com Elston & Ellis (1998)	33
Tabela 2 -	Classificação histológica proposta por Goldschmidt et al, 2011.....	35
Tabela 3 -	Descrição dos anticorpos e suas diluições.....	45
Tabela 4 -	Distribuição das lesões mamárias por tipo e grau histológico.....	49
Tabela 5 -	Teste de proporção entre o grau das lesões malignas.....	50
Tabela 6 -	Distribuição das neoplasias mamárias entre as diferentes raças.....	50
Tabela 7 -	Correlação entre grau, idade e tamanho tumoral.....	51
Tabela 8 -	Correlação entre o grau tumoral e parâmetros relacionados ao prognóstico.....	53
Tabela 9 -	Correlação entre o grau histológico e os marcadores moleculares Ki-67, HER-2, COX-2, P63, vimentina e e-caderina.....	55
Tabela 10 -	Correlação entre os tipos histológicos mais agressivos e os marcadores Ki-67, HER-2, COX-2, P63, vimentina e e-caderina.....	60
Tabela 11 -	Avaliação histopatológica e imuno-histoquímica dos pacientes.....	61
Tabela 12 -	Dados clínicos dos pacientes.....	61

RESUMO

Silva TC. *Análise dos tipos histológicos do câncer de mama em cadelas e sua correlação com o perfil de expressão de proteínas associadas ao prognóstico* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

INTRODUÇÃO: Embora os avanços na oncologia sejam significativos, o câncer continua sendo um desafio para a ciência médica. Neste contexto, o diagnóstico precoce assume grande relevância, visto que as ferramentas diagnósticas têm permitido o planejamento terapêutico e a definição mais precisa do prognóstico. Dentre as ferramentas mais utilizadas na Medicina Veterinária destacam-se a histopatologia e a imuno-histoquímica. O presente trabalho, além de definir a casuística das neoplasias mamárias caninas, faz uma comparação entre os resultados histopatológicos e imuno-histoquímicos permitindo a definição de assinaturas morfológicas e moleculares associadas a parâmetros de pior prognóstico já definidos pela literatura. **MÉTODOS:** Foram analisadas 129 amostras parafinadas de carcinoma mamário em cadelas por histopatologia e imuno-histoquímica, correlacionando o perfil de expressão das proteínas COX-2, HER-2, Ki-67 e E-caderina, vimentina e p63 com os subtipos histopatológicos de neoplasias mamárias em cadelas definidos na histopatologia. **RESULTADOS:** Das 129 amostras 7,7% (10/129) eram não neoplásicas, 7,7% (10/129) eram benignas e 84,5% (109/129) eram malignas. O tipo de tumor mais frequente foi o carcinoma em tumor misto 26,3% (34/129). Das 109 cadelas com tumor mamário maligno, 67 (61,4%) apresentaram tumores grau I, ou de histopatologia mais favorável. Quarenta e dois cães (38,6%) tiveram tumores de grau II e III ou de pior prognóstico histológico. Os tumores de grau III apresentaram maior grau de necrose, infiltração linfocitária, invasão linfática, desmoplasia e microcalcificação que os tumores de grau I e II. Os painéis de expressão proteica revelados pela IHC evidenciaram correlação entre grau histológico e expressão de Ki-67, HER-2, COX-2, p63, vimentina e e-caderina. Considerando os tipos histológicos mais agressivos, como carcinomas sólidos e anaplásicos e carcinosarcoma, observou-se que 66% de carcinomas sólidos, 80% de carcinomas anaplásicos e 66% de carcinosarcomas apresentaram alto índice de proliferação pelo Ki67. Outros marcadores confirmaram a associação desses subtipos histológicos com outras variáveis de IHC de pior prognóstico. **CONCLUSÕES:** Os resultados deste estudo mostraram uma correlação entre os parâmetros histopatológicos e os marcadores imuno-histoquímicos no tumor de grau I, II e III. No entanto, alguns tumores de grau I podem apresentar um indicador de painel imuno-histoquímico de mau prognóstico e ser subestimados se apenas foram avaliados por histopatologia. Por esta razão, a definição de linhas de tratamento e o prognóstico baseados apenas na análise histopatológica é limitado e deve ser complementado por imuno-histoquímica. Além disso, uma alta prevalência de tumores malignos mamários e a semelhança de tipos histológicos e perfis de coloração imuno-histoquímica qualificam a população canina como modelo promissor para estudos de câncer translacional.

Descritores: neoplasias da mama; patologia; imuno-histoquímica; cães; patologia veterinária; prognóstico.

SUMMARY

ABSTRACT

Silva TC. *Analysis on histological types of breast cancer in female dogs and their correlation with the expression profile of proteins associated with prognosis* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

INTRODUCTION: Despite significant advances in oncology, cancer remains a challenge for medical science. Early diagnosis is important in this context because the diagnostic tools have enabled therapeutic planning and more precise definition of the prognosis. Histopathology and immunohistochemistry are among the tools most used within veterinary medicine. In addition to defining a sample of cases of canine mammary neoplasia, the present study compared histopathological and immunohistochemical results and thus made it possible to define morphological and molecular signatures that were associated with parameters for worse prognoses that had already been defined in the literature. **METHODS:** A total of 129 paraffin-embedded mammary carcinoma samples were analyzed histopathologically and immunohistochemically. The expression profiles of the proteins COX-2, HER-2, Ki-67, E-cadherin, vimentin and p63 were correlated with the histopathological subtypes of breast neoplasms in female dogs that were defined. **RESULTS:** Out of the 129 samples, 7.7% (10/129) were non-neoplastic, 7.7% (10/129) were benign and 84.5% (109/129) were malignant. The most frequent tumor type was mixed-tumor carcinoma, in 26.3% (34/129). Among the 109 female dogs with malignant mammary tumors, 67 (61.4%) presented grade I tumors, or more favorable histopathology. Forty-two (38.6%) had grade II and III tumors or worse histological prognosis. Grade III tumors had higher degrees of necrosis, lymphocytic infiltration, lymphatic invasion, desmoplasia and microcalcification than did grade I and II tumors. The protein expression panels revealed through immunohistochemical analysis showed correlations between histological grade and expression of Ki-67, HER-2, COX-2, p63, vimentin and e-cadherin. Among the more aggressive histological types such as solid and anaplastic carcinomas and carcinosarcoma, it was observed that 66% of solid carcinomas, 80% of anaplastic carcinomas and 66% of carcinosarcomas presented high proliferation rates, shown by Ki67. Other markers confirmed the association of these histological subtypes with other immunohistochemical variables for worse prognosis. **CONCLUSIONS:** The results from this study showed correlations between the histopathological parameters and the immunohistochemical markers in tumors of grades I, II and III. However, it was seen that some grade I tumors with immunohistochemical panels indicating poor prognosis could be underestimated if they were only evaluated by histopathology. For this reason, definition of treatments and prognoses based only on histopathological analysis is limited and should be complemented by immunohistochemistry. In addition, the high prevalence of malignant mammary tumors and the similarity of histological types and immunohistochemical staining profiles qualify the canine population as a promising model for translational cancer studies.

Descriptors: breast neoplasms; pathology; immunohistochemistry; dogs; pathology, veterinary; prognosis.

SUMÁRIO

Sumário

	Lista de abreviaturas	
	Lista de tabelas	
	Resumo	
	Summary	
1	INTRODUÇÃO.....	23
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1	Carcinoma Mamário.....	25
2.2	A histopatologia como ferramenta de diagnóstico e prognóstico.....	32
2.2.1	Grau histológico.....	32
2.2.2	Classificação histológica.....	34
2.2.	A imuno-histoquímica como ferramenta de diagnóstico e prognóstico.....	36
3	JUSTIFICATIVA.....	40
4	OBJETIVOS.....	41
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	42
5.1	Pacientes.....	42
5.2	Diagnóstico.....	42
5.3	Execução das técnicas laboratoriais.....	42
5.3.1	Obtenção das amostras.....	42
5.3.2	<i>Tissue microarray</i> (TMA)	43
5.3.3	Imuno-histoquímica (IHQ)	44
5.4	Análise estatística.....	47
6	RESULTADOS.....	48
7	DISCUSSÃO.....	62
8	CONCLUSÃO.....	68
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de óbito em seres humanos e animais (Jemal *et al*, 2009; Siegel *et al*, 2014). Em virtude desta crescente prevalência, a oncologia têm sido foco de numerosos avanços em pesquisa e desenvolvimento.

Por muito tempo, na Medicina Veterinária, o câncer esteve associado apenas à morte ou eutanásia. Porém, atualmente, o convívio estreito dos animais de companhia, faz com que seus proprietários busquem por recursos que garantam qualidade de vida a seus animais e permitam o desenvolvimento de uma oncologia veterinária que objetiva, não apenas a compreensão das neoplasias de animais como modelos experimentais para humanos, mas também o bem estar desses (Biondi *et al*, 2014; Porrello *et al*, 2006; Vastag, 1999).

A busca por novas linhas de diagnóstico e tratamento, bem como de perspectivas de prevenção e controle do câncer em animais, têm motivado o desenvolvimento de pesquisas que visam a compreensão dos mecanismos moleculares que levam ao desenvolvimento desta doença. Os resultados destas pesquisas têm gerado ganhos à Medicina Veterinária e aplicações em Medicina Translacional.

Embora os avanços na oncologia sejam significativos, o câncer continua sendo um desafio para a ciência médica. Neste contexto, o diagnóstico precoce assume grande relevância, visto que as ferramentas diagnósticas têm permitido o planejamento terapêutico e a definição mais precisa do prognóstico. Dentre as ferramentas mais utilizadas na Medicina Veterinária destacam-se a histopatologia e a imuno-histoquímica (Cassali *et al*, 2014).

A histopatologia é a principal ferramenta diagnóstica utilizada por médicos veterinários e se baseia na identificação morfológica das células permitindo um diagnóstico preciso em muitas neoplasias, oferecendo informações importantes que podem ser correlacionadas ao prognóstico e ao planejamento terapêutico (Cassali et al, 2014).

A imuno-histoquímica é uma técnica que permite a localização e visualização de antígenos específicos no tecido neoplásico, caracterizando uma assinatura antigênica do tumor que, como a histopatologia, pode também ser associada ao prognóstico e planejamento terapêutico (Gama, 2011; Peña *et al*, 2014).

O presente trabalho, além de definir a casuística das neoplasias mamárias caninas, faz uma comparação entre os resultados histopatológicos e imuno-histoquímicos permitindo a definição de assinaturas morfológicas e moleculares associadas a parâmetros de pior prognóstico já definidos pela literatura.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CARCINOMA MAMÁRIO

O câncer de mama é a malignidade mais frequente e uma das principais causas de morte entre as mulheres no mundo (Jemal *et al*, 2009; Siegel *et al*, 2014). Cerca de um milhão de mulheres recebem o diagnóstico de câncer de mama a cada ano, sendo este responsável por cerca de 400.000 mortes no mesmo período (Kásler *et al*, 2009; Siegel *et al*, 2014; Karangadan *et al*, 2016).

As neoplasias mamárias são muito heterogêneas tendo sua carcinogênese relacionada a fatores genéticos e ambientais (Brennan *et al*, 2010). Muitos fatores de risco já foram bem descritos no câncer de mama, tais como: idade (Ravdin *et al*, 2007; Breen *et al*, 2011), menarca precoce (<12 anos), menopausa tardia (>55 anos) (Kelsey *et al*, 1993; Hulka & Moorman, 2001), histórico familiar (Hemminki *et al*, 2008), fatores genéticos (Schlehe & Schmutzler, 2008), obesidade, uso combinado de estrógenos e progesteronas, consumo de álcool, comportamento reprodutivo, sedentarismo, exposição à radiação e disfunções endócrinas (Dolle *et al*, 2009; Hulka & Moorman, 2008; Claus *et al*, 1997). Entretanto, a etiologia exata da doença ainda não foi totalmente esclarecida (Fénickel & Brucker-Davis, 2008).

O câncer de mama é dividido em estágios pré-invasivo e invasivo (Al-Dhaheri *et al*, 2008). As fases histológicas pré-invasivas como hiperplasia comum, hiperplasia atípica e carcinoma ductal *in situ* usualmente precedem a neoplasia invasiva (Hwang *et al*, 2004; Mouser *et al*, 2010).

Outro critério importante de classificação das neoplasias mamárias se baseia no perfil de expressão molecular (Perou *et al*, 2000; Sorlie *et al*, 2001). Na mulher, já é bem determinado o valor prognóstico e preditivo das mutações em p53 e HER-2 (Crosier *et al*, 1999), bem como dos marcadores Ki67, PCNA, caspase-3, catepsina D e E-caderina (Peña *et al*, 1998; Eisenberg & Koifman, 2001).

Os seres humanos e seus animais de estimação compartilham o mesmo ambiente, o que sugere que os animais possam ser considerados "sentinelas ambientais", permitindo uma avaliação oportuna da carcinogênese e dos inúmeros agentes de exposição que podem elevar os riscos de câncer (Porrello *et al*, 2006; Vastag, 1999).

O comportamento biológico de algumas malignidades, incluindo carcinoma da mama, compartilha uma biologia similar em cães e seres humanos, o que torna os cães, bons modelos para estudos do carcinoma mamário humano (Cohen *et al*, 1974, Nguyen *et al*, 2017).

Os carcinomas mamários são as neoplasias mais comuns em cadelas e frequentemente se tornam fatais devido ao desenvolvimento de metástases (Benjamin *et al*, 1999). Estima-se uma incidência anual de 182 novos casos para cada 100.000 cadelas, considerando que a castração precoce praticada em muitos países tem diminuído consideravelmente a incidência das neoplasias mamárias em cadelas (Merlo *et al*, 2008). Nesta espécie, a incidência tumoral aumenta a partir dos seis anos de idade, sendo os picos em cadelas com idade entre nove e 11 anos (Perez-Alenza *et al*, 2000).

Cerca de 50% de todos os tumores em cadelas são mamários (Cassali *et al*, 2014). Estes tumores mostram claramente um desenvolvimento hormônio-dependente de esteróides, como sugerido pelos efeitos protetores da castração precoce (Kurzman &

Gilbertson, 1986; Kitchell, 1995; Martin *et al*, 1984; DeNardi *et al*, 2002). Alguns autores relatam que cadelas castradas antes do primeiro ciclo estral possuem uma chance de aproximadamente 0,5% de desenvolver neoplasia de mama. Esta chance aumenta para 8% se a castração ocorrer após o primeiro estro e para 26% com a castração após o segundo estro (Schneider *et al*, 1969). Por outro lado, a ovário-salpingo-histerectomia, realizada em idades posteriores, não parece desempenhar um papel na redução do risco de desenvolvimento de tumores mamários malignos nas espécies canina (Novosad, 2003). Neoplasias mamárias caninas geralmente se apresentam como nódulos circunscritos com tamanho, consistência e mobilidade variáveis (Cassali *et al*, 2011).

As metástases para os linfonodos regionais representam o primeiro passo no processo metastático e um dos mais importantes fatores prognóstico do carcinoma mamário em cadelas e em humanos (Fitzgibbons *et al*, 2000). O comprometimento linfonodal é frequentemente seguido do desenvolvimento de metástases à distância, principalmente no pulmão, o que gera um desfecho fatal para a doença (Misdorp & Hart, 1979).

O estadiamento do carcinoma mamário em humanos e animais tem sido feito segundo a classificação TNM (Owen, 1980) e a classificação histológica da Organização Mundial de Saúde (Misdorp *et al*, 1999). No Brasil, a classificação mais utilizada para as neoplasias mamárias caninas é a descrita por Cassali (2011). Atualmente, a classificação de Goldschmidt (2011) para as neoplasias mamárias caninas tem sido adotada por alguns centros de diagnóstico veterinário no mundo e pela maioria das revistas científica por definir entidades histopatológicas mais relacionadas ao prognóstico quando comparada à classificação da Organização Mundial da Saúde.

A cirurgia de ressecção do tumor é a mais efetiva linha de tratamento para o controle regional da doença, excetuando-se os casos de carcinomas inflamatórios. A excisão cirúrgica pode ser curativa nos tumores pequenos, não invasivos, não metastáticos e bem diferenciados. Tumores com características histopatológicas mais agressivas requerem terapias adicionais, como a quimioterapia (Sorenmo, 2003; Cassali et al, 2014).

A extensão do procedimento cirúrgico depende do estadiamento, drenagem linfática, tamanho e localização das lesões. A nodulectomia pode ser considerada para a excisão de nódulos menores que 0,5 cm, únicos, sólidos, superficiais e não aderentes. Lesões maiores geram a necessidade de remoção de toda a glândula mamária. A mastectomia única pode ser indicada para nódulos de até 3 cm que afetam apenas uma mama, embora nestes casos seja mais adequado a realização da mastectomia regional com a finalidade de se remover as comunicações linfáticas da glândula afetada por estas formações. Por fim, a mastectomia radical com excisão de toda a cadeia mamária uni ou bilateral é o procedimento mais adequado para formações maiores do que 3 cm ou quando há múltiplas lesões (Sorenmo et al, 2013).

Stratmann et al (2008) descreveu a mastectomia radical como a melhor opção cirúrgica independente do número e tamanho das lesões mamárias, diminuindo as chances de recidiva nas mamas vizinhas e metástases.

Procedimentos cirúrgicos agressivos como a mastectomia uni ou bilateral podem prevenir o desenvolvimento de novos tumores mamários e beneficiar os pacientes. Entretanto, a invasividade destes procedimentos implicam em maior taxa de complicações trans e peri operatórias. Por este motivo, é fundamental o estabelecimentos de fatores prognósticos estabelecidos por histopatologia e imuno-

histoquímica no momento do diagnóstico para a definição da técnica cirúrgica que ofereça melhora qualidade de vida pós operatória sem, no entanto, prejudicar o controle tumoral (Polton, 2009 e Sorenmo, 2013).

Além do conhecimento prévio do comportamento tumoral por meio da análise de fatores prognóstico, o sucesso de uma cirurgia no controle dos tumores de mama, requer o conhecimento da drenagem linfática da cadeia mamária (Cassali et al, 2014).

O sistema linfático é a principal rota de metástases dos tumores malignos das glândulas mamárias. Por isso, no ato cirúrgico, é fundamental a excisão dos linfonodos regionais para o controle de metástases e para a definição do prognóstico através da análise histopatológica (Patsikas e Dessiris, 2006). Para tanto, é necessário compreender a drenagem linfática da cadeia mamária para a escolha dos linfonodos a serem excisados cirurgicamente. As glândulas torácicas craniais e caudais drenam para os linfonodos axilares ipsilaterais. As glândulas abdominais craniais drenam principalmente para os linfonodos axilares, embora também possam ter vias de drenagem para os linfonodos inguinais ipsilaterais. As glândulas abdominais caudais e inguinais drenam para o linfonodo inguinal superficial ipsilateral. Porém, é importante considerar que as glândulas mamárias neoplásicas podem estabelecer padrões de drenagem variáveis, especialmente com a glândula mamária normal adjacente. Por isso, ferramentas de verificação da drenagem linfática transoperatórias com o uso de azul patente são fundamentais para a escolha dos linfonodos (Cassali *et al*, 2014).

Figura 1: Representação esquemática da drenagem linfática das glândulas mamárias torácicas craniais e caudais (a), das glândulas craniais abdominais (b), das caudais abdominais (c) e das inguinais (d). Na imagem são representadas as glândulas mamárias torácicas craniais (1), torácicas caudais (2), abdominais craniais (3), abdominais caudais (4) e inguinais (5), linfonodos axilares (ax), linfonodos esternais (st), linfonodos ilíacos mediais (mi), linfonodos inguinais superficiais (in) e os linfonodos poplíteos (pl) (Patsikas e Dessiris, 2006).

A quimioterapia adjuvante é de grande relevância na prevenção e retardo das recidivas e metástases. Tumores inoperáveis e metastáticos ao diagnóstico podem representar indicação à quimioterapia neoadjuvante. Além disso, entidades histopatológicas agressivas como carcinomas sólidos, carcinomas micropapilares,

carcinomas anaplásicos e carcinosarcomas representam indicação à quimioterapia mesmo na ausência de comprometimento linfonodal ou evidência de metástase pulmonar (Cassali et al, 2014). Embora a quimioterapia tenha sido usada rotineiramente em cães com neoplasias mamárias malignas, a sua eficácia é limitada na maioria dos casos (Tran et al, 2014). Quimioterápicos como paclitaxel (Poirier et al, 2004 e Von EH Rivera et al, 2013), doxorrubicina (Ogilvie et al, 1989 e Hahn et al, 1992), carboplatina (Hahn et al, 1992) , gencitabina (Marconatto et al, 2008) mitoxantrona (Ogilvie et al, 1991) tem gerado respostas mensuráveis em muitos trabalhos, porém todos com amostras muito pequenas o que torna incerto o benefício da quimioterapia na elevação da sobrevida dos animais. Estudo retrospectivo com 94 cães não encontrou diferença significativa na sobrevida de grupos que receberam quimioterapia após a cirurgia com sobrevida média de 228 dias e grupos que realizaram apenas a cirurgia para o controle tumoral com sobrevida média de 194 dias, embora cinco cães que receberam mitoxantrona e carboplatina tenham apresentado uma sobrevida média de 1139 dias (Tran et al, 2014). Lavallo et al (2012) demonstraram que animais tratados com carboplatina, com ou sem associação dos inibidores de COX-2, tiveram aumento significativo de sobrevida.

A combinação de doxorrubicina e ciclofosfamida é a mais descrita na literatura e a mais associada à elevação da sobrevida, embora mais estudos sejam necessários (Lavallo et al, 2012; Sorenmo et al, 2013).

O prognóstico das neoplasias mamárias em cadelas é definido por fatores clínicos e patológicos tais como o tamanho do tumor, o envolvimento linfonodal, o tipo e grau histológico e a determinação de marcadores moleculares.

2.2. A HISTOPATOLOGIA COMO FERRAMENTA DE DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO

A histopatologia tem sido empregada para o diagnóstico, análise das margens cirúrgicas e avaliação da presença de metástases em linfonodos (Cassali et al, 2014).

O exame histopatológico permite avaliar a infiltração cutânea, de tecidos e vasos circunvizinhos ao tumor. Além disso, a análise histomorfológica do tumor permite a identificação de pleomorfismo, grau de diferenciação, índice mitótico e presença de necrose. Todos estes parâmetros podem ser relacionados ao prognóstico (Ferreira *et al*, 2003).

A avaliação da integridade da camada celular basal/mioepitelial é um critério importante para o diagnóstico e prognóstico das neoplasias mamárias. A identificação de regiões de microinvasão desta camada basal define uma lesão maligna invasiva e associada a pior prognóstico, ao passo que a integridade desta camada caracteriza o fenótipo *in situ* associado a melhor prognóstico (Sternlicht *et al*, 1997; Yaziji *et al*, 2000).

2.2.1. Grau histológico

O grau histológico é definido de acordo à arquitetura da neoplasia e às variações morfológicas que podem ser relacionadas à agressividade do tumor (Elston e Ellis, 1991). A definição do grau histológico é baseada na somatória de uma pontuação que considera o índice de formação de túbulos (1 ponto: mais de 75% do tumor é composto por túbulos; 2 pontos: entre 10 e 75% de formações tubulares; e 3 pontos: os túbulos

ocupam menos de 10% do tumor), o pleomorfismo nuclear (1 ponto: núcleos regulares e pequenos; 2 pontos: moderado aumento no tamanho e variação na forma dos núcleos; e 3 pontos: marcado pleomorfismo com grande variação no tamanho e forma dos núcleos) e o índice mitótico (1 ponto: 0-8 mitoses; 2 pontos: 9-16 mitoses; e 3 pontos: mais de 17 mitoses por campo em lente de 40x). O grau histológico do tumor é obtido pela soma dos escores citados acima. Desta forma, o grau I é caracterizado por 3 a 5 pontos, o grau II por 6 a 7 pontos e o grau III por 8 a 9 pontos. A anaplasia é maior nos graus mais elevados (Cassali *et al*, 2014). Estudos revelam correlação significativa entre o grau histológico e outros fatores prognóstico como o tipo histológico e a sobrevida (Dutra *et al*, 2008; Karayannopoulou *et al*, 2005).

Tabela 1: Sumário de graduação histopatológica do carcinoma mamário de acordo com Elston & Ellis (1998).

Atributo	Escore
<i>Formação de túbulos</i>	
> 75% do tumor	1
10 a 75% do tumor	2
< 10% do tumor	3
<i>Pleomorfismo nuclear</i>	
Tamanho nuclear semelhante ao de células normais (2 a 3 vezes o tamanho dos eritrócitos)	1
Moderado aumento do tamanho nuclear	2
Marcada variação nuclear	3
<i>Índice mitótico</i>	
0 a 8 mitoses/ campo de 10x	1
9 a 16 mitoses/ campo de 10x	2
17 ou mais mitoses/ campo de 10x	3

Estudos revelam significativa correlação entre o grau histológico e a sobrevida, bem como outros fatores prognósticos como o tipo histológico (Cavalcanti & Cassali, 2006; Dutra *et al*, 2008; Dutra *et al*, 2004; Estrela-Lima *et al* 2010; Karayannopoulou *et al*, 2005; Neto *et al*, 2003).

2.2.2. Classificação histológica

Os métodos de classificação histológica das neoplasias mamárias em cadelas são variáveis e novas classificações tem sido propostas. Em 1974 a Organização Mundial da Saúde publicou a primeira classificação histológica internacional dos tumores dos animais domésticos (Misdorp et al, 1971; Misdorp W et al, 1972, Misdorp W et al, 1973). Uma modificação desta classificação foi publicada em 1999 (Misdorp et al, 1999). Porém, após isso, muitas classificações tem sido propostas revelando novos subtipos histológicos. Em 2011, Goldschmidt et al publicou uma nova proposta de classificação com novas entidades histológicas que tem sido utilizada atualmente e é descrita na tabela abaixo.

Tabela 2: Classificação histológica proposta por Goldschmidt et al, 2011.

<p>1: Neoplasias Epiteliais Malignas.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Carcinoma in situ. • Carcinoma simples. <ul style="list-style-type: none"> a. Tubular. b. Tubulopapilar. c. Cístico-papilar. d. Cribiforme. • Carcinoma micropapilar invasivo. • Carcinoma sólido. • Comedocarcinoma. • Carcinoma anaplástico. • Carcinoma decorrente de adenoma complexo/ tumor misto: é possível detectar áreas benignas na secção tecidual. • Carcinoma complexo: o componente epitelial é maligno e o mioepitelial é benigno. • Carcinoma e mioepitelioma maligno: os componentes epitelial e mioepitelial são malignos. • Carcinoma em tumor misto: o componente epitelial é maligno, o componente mesenquimal mioepitelial é benigno e o componente mesenquimal é cartilagem ou osso. • Carcinoma ductal: vertente maligna do adenoma ductal. • Carcinoma papilar intraductal: vertente maligna do adenoma papilar intraductal. 	<p>3: Neoplasias Mesenquimais Malignas – Sarcomas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Osteossarcoma. • Condrossarcoma. • Fibrossarcoma. • Hemangiossarcoma. • Outros sarcomas.
<p>2: Neoplasias Epiteliais Malignas – Tipos Especiais</p> <ul style="list-style-type: none"> • Carcinoma de células escamosas. • Carcinoma adenoescamoso. • Carcinoma mucinosos. • Carcinoma secretório rico em lipídeos. • Carcinoma de células fusiformes. <ul style="list-style-type: none"> a. Mioepitelioma maligno. b. Carcinoma fusiforme de células escamosas. c. Carcinoma fusiforme. • Carcinoma inflamatório. 	<p>4: Carcinossarcoma – Tumor mamário misto maligno</p>
	<p>5: Neoplasias benignas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Adenoma simples. • Adenoma papilar intraductal. • Adenoma ductal (adenoma basalóide). • Fibroadenoma. • Mioepitelioma. • Adenoma complexo • Tumor misto benigno
	<p>6: Hiperplasia/ Displasia</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ectasia ductal. • Hiperplasia lobular (adenose). <ul style="list-style-type: none"> a. Regular b. Com atividade secretória (lactacional). c. Com fibrose d. Com atipia • Epiteliiose. • Papilomatose. • Variação fibroadenomatosa. • Ginecomastia
	<p>7: Neoplasias do mamilo</p> <ul style="list-style-type: none"> • Adenoma. • Carcinoma. • Carcinoma com infiltração edidérmica.
	<p>8: Hiperplasia/ Displasia do mamilo</p> <ul style="list-style-type: none"> • Melanose da pele do mamilo.

A significância prognóstica dos tipos histológicos tem sido descrita por muitos pesquisadores (Clemente et al, 2010; Karayannopoulou et al, 2005; Misdorp et al, 1999). As entidades histológicas associadas a pior prognóstico são o carcinoma anaplásico, o carcinoma sólido e o carcinossarcoma, embora a análise da graduação deva ser complemento na predição do comportamento das neoplasias mamárias em cadelas pelo exame histopatológico (Cassali et al, 2013).

2.3. A IMUNO-HISTOQUÍMICA COMO FERRAMENTA DE DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO

Como na medicina, muitos estudos têm sido desenvolvidos na tentativa de se identificar um perfil de marcadores envolvidos no desenvolvimento das neoplasias mamárias caninas.

Neste contexto, a imuno-histoquímica tem se mostrado, paralelamente à histopatologia convencional, uma importante ferramenta diagnóstica e de identificação de marcadores prognósticos e preditivos (Gama, 2011; Peña *et al*, 2014). Desta forma, marcadores como receptores de estrógeno e progesterona, COX-2, Ki-67, E-caderina, HER-2 e p63 têm permitido uma nova classificação das neoplasias mamárias, que parece ter influência maior na predição e prognóstico que a histopatologia (Ferreira *et al*, 2009).

A expressão de marcadores mesenquimais pelas células neoplásicas está relacionada a menor grau de diferenciação celular e, portanto, pior prognóstico (Kaufmann *et al*, 2001). Muitos marcadores mioepiteliais tem sido utilizados para avaliar diferenciação celular. Marcadores de células musculares lisas como SMA e calponina são sensíveis, porém marcam miofibroblastos do estroma tumoral e das células musculares lisas dos vasos sanguíneos, o que pode dificultar a interpretação quali e quantitativa da marcação (Dewar *et al*, 2011; Mosunjac *et al*, 2000). O P63 é um marcador mioepitelial nuclear de elevada sensibilidade e que apresenta como principal vantagem o fato de não ser expresso por miofibroblastos e células da musculatura lisa vascular (Dewar *et al*, 2011). Desta forma, o p63 pode ser importante indicador de transição mioepitelial quando presente nas células neoplásicas, ou permitir ao patologista avaliar a integridade da camada de células mioepiteliais que revestem os

ductos da glândula mamária, possibilitando a correlação com o grau de invasividade dos tecidos adjacentes (Gama et al, 2003). A vimentina também é um marcador citoplasmático de transição epitélio mesenquimal cuja marcação nas células neoplásicas pode estar associada a pior prognóstico (Kokkinos et al, 2007).

Assim como a aquisição de características mesenquimais, a perda da expressão de proteínas que configuram as células epiteliais também está associada a malignidade. Desta forma, a diminuição na expressão de e-caderina, uma proteína associada a adesão celular, pode estar relacionada a maior incidência de metástases e, pior prognóstico (Yoshida et al, 2014). A expressão das citoqueratinas também pode ser relevante na análise da preservação das características epiteliais, em especial a citoqueratina 19, cuja perda de expressão se relacionada a menor sobrevida (Morris, 2010).

A superexpressão d do receptor do fator de crescimento epidérmico HER-2 no tecido neoplásico mamário está relacionada com perfis clinicopatológicos agressivos marcados pelo desenvolvimento de metástases e menor sobrevida em humanos (Burstein, 2005; Yamauchi et al, 2001). Em cães, a significância do aumento da expressão de HER-2 não é clara, havendo grande variabilidade de resultados nas pesquisas sem que haja consenso no valor prognóstico deste marcador (Dutra et al, 2004; Espinosa de los Monteros et al, 2005; Hsu et al, 2009; Martin de las Mulas et al, 2005; Ressel et al, 2013; Karangadan et al, 2016).

A avaliação da taxa de proliferação tumoral é importante na definição molecular de um painel associado à pior prognóstico (Cassali et al, 2011). De forma geral, tumores com maiores índices de proliferação apresentam curso mais agressivo com aumento do risco de metástases (Sorenmo, 2003; Karangaden et al, 2016). Por este motivo, tem-se estudado o papel de muitos marcadores de proliferação celular nas neoplasias, tais como

o antígeno nuclear de proliferação celular – PCNA e o Ki-67. O PCNA é expresso apenas em células que estão na fase S do ciclo celular, enquanto que o Ki-67 é expresso em todas as fases do ciclo celular, exceto G0 (Horta et al, 2012).

A expressão de receptores hormonais também tem sido avaliada na neoplasias mamárias caninas. Assim como no ser humano, a expressão de receptores de estrógenos e progesterona está relacionada a melhor prognóstico em cães (Graham et al, 1999, Sorenmo, 2003). Porém, a presença de imuno marcação dos receptores de estrógeno e progesterona em lesões benignas pré-neoplásicas da mama denotam a dificuldade de se interpretar o real valor prognóstico destes marcadores (Mouser et al, 2010). Além disso, a influência hormonal nas diferentes fases do ciclo estral e o status reprodutivo da cadela castrada e não castrada podem interferir na expressão dos receptores hormonais, devendo ser considerados na interpretação dos achados imuno-histoquímicos das neoplasias mamárias (Vasconcellos et al, 2006).

A expressão da enzima COX-2 nos processos neoplásicos está relacionada à progressão tumoral em humanos e cães, sendo considerada um fator prognóstico ruim para várias neoplasias (Horta et al, 2012). A COX-2 e seus produtos inibem a apoptose, diminuem a adesão celular, destroem a membrana basal, induzem proliferação celular, favorecem a angiogênese e mantêm a resposta inflamatória que contribui para a carcinogênese (Cassali et al, 2011). A expressão aumentada desta enzima também possui valor preditivo dada a possibilidade de tratamento adjuvante com inibidores seletivos de COX-2 (Cassali et al, 2011).

Outros marcadores moleculares tem sido avaliados na tentativa de criar assinaturas tumorais capazes de definir com maior precisão o comportamento das diferentes neoplasias mamárias. Receptores de andrógenos, p16, p53, GATA3, Pelp1,

napsin A e TTF-1 são descritos na literatura por seu potencial no diagnóstico, prognóstico e predição de novas terapias (Peng et al, 2017). Porém ainda são necessários mais estudos para corroborar o papel destes novos painéis moleculares.

O desenvolvimento da técnica de *Tissue Microarray* (TMA) tem permitido a diminuição dos custos das análises imuno-histoquímicas e possibilitado que mais pacientes possam se beneficiar da predição prognóstica e terapêutica que a determinação das assinaturas moleculares das neoplasias mamárias possa oferecer. O maior obstáculo para o uso desta técnica reside no reduzido tamanho da amostra analisada e na grande heterogeneidade das neoplasias mamárias, o que poderia comprometer a análise dos padrões de expressão protéica de todo o tecido tumoral (Camp et al, 2000). Porém, muitos estudos de validação vem sendo realizados para diversos marcadores moleculares, mostrando que a antigenicidade de alguns marcadores é preservada por mais de 60 anos em amostras parafinadas (Camp et al, 2000). Além disso, a análise de marcação de receptores de estrógeno e progesterona e de HER-2 em dois discos de 0,6 mm é comparável à análise de todo o tecido neoplásico em 95% dos casos (Camp et al, 2000; Glajcar et al, 2013). Outro trabalho avaliou a marcação de PCNA, vimentina e citoqueratinas em tumores mistos, os quais possuem grande heterogeneidade tecidual, evidenciando resultados de compatibilidade entre as análises de um fragmento de 1 mm e da amostra tumoral inteira (Silva et al, 2016). Choi et al (2005) avaliaram a correlação entre o prognóstico e a expressão de receptores de estrógeno e progesterona, Bcl-2, HER-2, p53 e Ki-67 submetidos à técnica de TMA, encontrando correlação estatística significativa entre todos eles.

JUSTIFICATIVA

3. JUSTIFICATIVA

As neoplasias mamárias representam uma das principais causas de morte de mulheres no mundo, mesmo com todo o aparato biotecnológico já desenvolvido na busca de terapias mais eficazes. Por este motivo, faz-se fundamental a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos e a busca por novos marcadores que possam ter valor preditivo e/ou prognóstico, além de serem utilizados como alvos de estratégias terapêuticas direcionadas.

O câncer de mama na cadela possui comportamento biológico, epidemiologia, morfologia celular e fenotipagem similares aos do homem, o que faz dessa espécie um bom modelo experimental para compreensão dos mecanismos envolvidos na carcinogênese tumoral.

Portanto, baseado no que foi exposto, a avaliação do perfil de expressão protéica das neoplasias mamárias em cães permitirá a definição de uma assinatura da doença metastática com aplicações em oncologia médica e veterinária.

A hipótese principal deste estudo consiste na associação entre um painel de expressão protéica por imuno-histoquímica e os resultados de histopatologia nas neoplasias mamárias caninas.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

1. Correlacionar o perfil de expressão das proteínas COX-2, HER-2, Ki-67 e E-caderina, vimentina e p63 e subtipos histopatológicos de neoplasias mamárias em cadelas, determinando suas limitações na definição de prognóstico.
2. Avaliar a casuística das neoplasias mamárias benignas e malignas na população de cães estudada.
3. Sugerir novas condutas diagnósticas na abordagem das neoplasias mamárias caninas.
4. Compreender a patogênese das neoplasias mamárias caninas com objetivo de aplicação deste conhecimento em medicina translacional.

MATERIAL E MÉTODOS

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Pacientes

Foram utilizadas para este estudo amostras parafinadas de carcinoma mamário de cadelas que foram avaliadas entre outubro de 2012 a outubro de 2013 no Centro de Diagnóstico e Especialidades Veterinárias PROVET.

5.2. Diagnóstico

Todas as amostras parafinadas foram submetidas a revisão histológica centralizada por dois patologistas. Nas situações de divergência diagnóstica as amostras foram reavaliadas pelos patologistas para a definição do consenso expresso neste trabalho.

5.2.1. Classificação histológica das amostras.

A avaliação histológica das amostras coradas por eosina-hematoxilina (HE) foi baseada nos critérios de Goldschmidt et al (2011).

5.3. Execução das técnicas laboratoriais

5.3.1. Obtenção das amostras

As amostras foram obtidas de blocos parafinados de biópsias de carcinoma mamário.

5.3.2. *Tissue Microarray* (TMA)

Com a finalidade de otimizar o uso de reagentes e anticorpos, reduzir os custos e uniformizar as reações as reações de IHC foram realizadas pela técnica de *Tissue Microarray* (TMA) (Glajcar et al, 2013).

A primeira etapa da técnica consistiu no preparo dos blocos receptores à 56°C com parafina de elevada pureza para garantir a execução de cortes histológicos delgados e homogêneos, além de evitar possíveis rachaduras no ato da perfuração das agulhas, contendo polímero em molde com cassete comum. O recipiente foi mantido na estufa à 60°C *overnight* para retirada de bolhas e estabilizar a parafina. Em seguida foram retirados da estufa e imediatamente levados à geladeira para solidificação rápida. Após a solidificação da parafina, o bloco recebeu acabamento e foi aparado em micrótomo rotativo para garantir a superfície completamente reta e lisa. Determinada a profundidade entre 0,8 e 0,9cm, o “bloco receptor” estava pronto para receber os cilindros de até 0,6cm de profundidade (Glajcar et al, 2013).

A segunda etapa do processo envolveu a marcação das regiões de interesse nas lâminas coradas com HE e nos blocos de parafina pelo patologista. Subsequentemente, efetuou-se perfuração dos blocos receptores, assim como a perfuração exata das regiões anteriormente delimitadas pelo patologista nos blocos doadores. O material retirado do bloco previamente marcado foi depositado no bloco receptor. Ao final do depósito de todos os pontos, o bloco receptor foi colocado na estufa a 60°C e realizado o nivelamento dos pontos pressionando sua superfície em outra superfície lisa. Os blocos receptores foram cortados e as lâminas então foram banhadas em parafina para preservar a imunorreatividade das proteínas (Glajcar et al, 2013).

As lâminas foram então submetidos às reações imuno-histoquímicas.

5.3.3. Imuno-histoquímica - IHQ (Ruiz et al 2005)

Secções de 4 mm das amostras parafinadas foram desparafinadas em xileno, reidratadas em etanol e lavadas em tampão fosfato (PBS; pH 7.4, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄). A atividade endógena de peroxidase foi bloqueada por incubação em H₂O₂ 3% diluído em PBS por 30 minutos à 90°C. A recuperação antigênica foi realizada por fervura em Tris-EDTA ou citrato de acordo com a tabela 3 por 15 minutos em microondas ou por digestão enzimática com protease K 0,05% por 30 minutos a 37°C. Em seguida, as amostras foram lavadas três vezes em tampão fosfato salino (PBS) para posterior aplicação dos anticorpos primários em diluições específicas previamente determinadas com incubação por 18 horas a 4°C. O sistema de detecção de cada anticorpo primário foi usado de acordo com as instruções dos fornecedores (EnVision [K4001, Dako] e EnVision Plus [K4001, Dako]). As reações foram reveladas com 3,3'-diaminobezidina (D-5637; Sigma, St. Luis, MO, USA) adicionada a H₂O₂ 3% em tampão fosfato (pH 7.6). Controles positivos de amostras de tecidos humanos reativos para cada marcador foram utilizados para todas as reações. Como controle negativo utilizou-se a estratégia de substituição do anticorpo primário por albumina de soro bovino (BSA 1% em tampão fosfato pH 7,6) nas respectivas reações. A imunomarcação foi avaliada microscopicamente por dois patologistas. Nos casos em que houve divergência no diagnóstico de marcação, os patologistas reavaliaram as amostras com a finalidade de chegar ao consenso expresso nos resultados deste trabalho.

Tabela 3: Descrição dos anticorpos e suas diluições.

Anticorpo	Fornecedor	Clone	Diluição	Recuperação Antigênica
Vimentina	Dako	V9	1:1000	Citrato
Ki-67	Dako	MIB-1	1:500	EDTA
HER-2	Dako	HER-2	1-1200	Citrato
E-caderina	Dako	NCH-38	1:300	EDTA
P63	Dako	LP174	1:700	EDTA
COX-2	Dako	SP21	1:100	Citrato

De acordo com a expressão do antígeno Ki-67, tumores com marcação nuclear superior a 25% foram classificados como tendo alto índice de proliferação. Tumores com índice proliferativo intermediário apresentaram expressão de Ki67 de 10% a 25% e tumores com baixo índice de proliferação apresentaram marcação inferior a 10% (Cassali et al, 2013; Kim et al, 2013; Peña et al, 2014).

A análise da marcação de COX-2 foi realizada de forma semi-quantitativa e o escore de distribuição estimado em porcentagem de células positivas em cinco campos de alta amplificação (40x). O escore variou de 0 a 4, sendo o escore 0 representado por 0% de marcação, o escore 1 representado por 10% de positividade, o escore 2 representado por valores entre 10% a 30%, o escore 3 representado por 31% a 60% de marcação e, o escore 4 representado por valores superiores a 61% de positividade. Os escores 0 representaram ausência de marcação (-), o escore 1 representou expressão fraca (1+), o escore 2 marcação moderada (2+) e os escores 3 e 4 representaram forte marcação (3+) (Cassali et al, 2013; Kim et al, 2013; Peña et al, 2014).

A análise da proteína HER-2 foi semi-quantitativa e classificada em escores 0, 1+, 2+ e 3+. O score 0 foi caracterizado pela ausência de marcação na membrana plasmática; o escore 1+ por marcação na membrana e fraca e incompleta nas outras estruturas das células tumorais; o escore 2+ foi caracterizado quando havia marcação completa, desigual ou de fraca intensidade em mais de 10% das células tumorais ou por marcação completa e intensa nas membranas citoplasmáticas em menos de 30% das

células tumorais; o escore 3+ foi caracterizado como marcação completa, uniforme e intensa em mais de 30% das células tumorais. Foram consideradas positivas as amostras classificadas como 3+ (Cassali et al, 2013; Kim et al, 2013; Peña et al, 2014).

A análise de E-caderina também foi realizada de forma semi-quantitativa e classificada em 3 escores. O escore 1 foi caracterizado por mais de 75% de células marcadas e configurou o grupo positivo para E-caderina; o escore 2 foi caracterizado por marcação entre 25% e 75% das células, configurando um grupo heterogêneo de positividade e o escore 3 foi caracterizado por menos de 25% das células positivas, configurando o grupo negativo de expressão de E-caderina (Cassali et al, 2013; Kim et al, 2013; Peña et al, 2014).

A marcação de p63 foi classificada em três escores. O escore 0 caracterizado pela ausência de marcação, o escore 1 caracterizado por 1 a 10% de marcação, o escore 2 caracterizado por 11 a 30% de células positivas e, por fim, o escore 3 caracterizado por mais de 30% de marcação. Amostras com mais de 10% de células marcadas foram consideradas positivas (Cassali et al, 2013; Kim et al, 2013; Peña et al, 2014).

O critério de marcação da vimentina foi semi-quantitativo e graduado em 1+, 2+, 3+ e 4+. O escore 1+ foi caracterizado por menos de 20% das células tumorais marcadas, o escore 2+ foi caracterizado por 20 a 40%, o escore 3+ por 40 a 60% e o escore 4+ por mais de 60% de marcação nas células neoplásicas (Cassali et al, 2013; Kim et al, 2013; Peña et al, 2014).

5.4. Análise estatística

Foi realizado estimativa de proporção com os devidos intervalos de confiança com nível de 5% de significância. Para comparar se existem diferenças entre grupos foi realizado teste de proporção Qui-quadrado (Plackett, 1983).

Todas as análises foram realizadas no software R.

RESULTADOS

6. RESULTADOS

Das 159 amostras mamárias caninas coletadas, 129 (81,1%) tiveram blocos de parafina disponíveis para o estudo. As 25 (15,7%) amostras sem blocos disponíveis foram excluídas. Cinco amostras das 134 não puderam ser diagnosticadas por histopatologia, necessitando de imuno-histoquímica complementar e por isso, também foram excluídas.

À histologia em HE, 7,7% (10/129) das amostras eram não neoplásicas, 7,7% (10/129) eram benignas e 84,5% (109/129) malignas. O tipo de tumor mais frequente foi o carcinoma em tumor misto 26,3% (34/129), sendo o de grau I o mais frequente 70,5% (24/34), como mostrado na tabela 4.

Tabela 4: Distribuição das lesões mamárias por tipo e grau histológico.

Lesão	Tipo	Frequência	Grau		
			I	II	III
Lesões não neoplásicas	Hiperplasia ductal	1 (0.7%)			
	Adenose regular	8 (6.2%)			
	Cistos mamarios	1 (0.7%)			
	Subtotal	10 (7.7%)			
Benignas	Adenoma complexo	3 (2.3%)			
	Tumor benigno misto	7 (5.4%)			
	Subtotal - benignos	10 (7.7%)			
Malignas	Carcinoma em tumor misto	34 (26.3%)	24 (18.6%)	10 (7.7%)	
	Carcinoma complexo	21 (16.2%)	15 (11.6%)	6 (4.6%)	
	Carcinoma tubular	16 (12.4%)	16 (12.4%)		
	Carcinoma tubulopapilar	5 (3.8%)	3 (2.3%)	2 (1.5%)	
	Carcinoma sólido	9 (6.9%)	1 (0.7%)	6 (4.6%)	2 (1.5%)
	Carcinoma papilar	8 (6.2%)	2 (1.5%)	6 (4.6%)	
	Carcinoma ductal	6 (4.6%)	5 (3.8%)	1 (0.7%)	
	Carcinoma anaplásico	5 (3.8%)		4(3.1%)	1 (0.7%)
	Carcinoma cribiforme	2 (1.5%)	1 (0.7%)		1 (0.7%)
	Carcinossarcoma	3 (2.3%)		2 (1.5%)	1 (0.7%)
	Subtotal - malignos	109 (84.5%)	67 (51.9%)	37 (28.6%)	5 (3.8%)
Total		129 (100%)			

A análise estatística da proporção entre o grau histológico e a malignidade revelou diferença estatística para o nível de significância estabelecido ($p < 0,05$). Das 109 cadelas com tumor mamário maligno, 67 (61,4%) apresentaram tumores grau I, ou de histopatologia mais favorável. Quarenta e dois cães (38,6%) tiveram tumores de grau II e III ou de pior prognóstico histológico.

Tabela 5: Teste de proporção entre o grau das lesões malignas.

	Grau I	Grau II	Grau III	p valor
Lesão Malignas	n = 67 (61,47%) IC (51,6% à 70,5%)	n= 37 (33,94%) IC (25,3% à 43,8%)	n= 5 (4,59%) IC (1,7% à 10,9%)	0

Legenda: n: número de animais, IC: intervalo de confiança, p: nível de significância estabelecido por teste Qui-Quadrado.

A idade média ao diagnóstico foi de $9,8 \pm 2,7$ anos (2-16 anos). Neste estudo, houve predominância de tumores mamários em algumas raças de cães, como mostra a Tabela 6.

Tabela 6: Distribuição das neoplasias mamárias entre as diferentes raças.

Raça	% Afetados
Poodle	30 (22.5%)
SRD	19 (14.2%)
Yorkshire Terrier	13 (9.7%)
Maltes	12 (9.0%)
Labrador Retriever	12 (9.0%)
Cocker Spaniel	11 (8.2%)
Teckel	06 (4.5%)
Lhasa Apso	04 (3.0%)
Rottweiler	03 (2.2%)
Fox Paulistinha	03 (2.2%)
Pit Bull	03 (2.2%)
Pastor Alemão	03 (2.2%)
Golden Retriever	02 (1.5%)
Outros	12 (9.0%)

O tamanho médio das neoplasias benignas foi de $1,83 \pm 1,90$ cm (0,3-7,0 cm). O tamanho médio das neoplasias malignas de grau I foi de $1,33 \pm 1,1$ cm (0,2-4,5 cm). O tamanho médio dos tumores malignos de grau II foi de $2,92 \pm 2,3$ (0,2-9,0 cm). O tamanho médio das neoplasias malignas de grau III foi de $2,62 \pm 0,80$ cm (1,8-4,0 cm).

A tabela 7 revela maior frequência de tumor em cadelas com mais de 10 anos, as quais apresentam também maior frequência de tumores de grau II e III quando comparadas às cadelas com menos de 10 anos. Não houve correlação estatística entre malignidade e idade do animal, porém o tamanho tumoral apresentou importância estatisticamente significativa na correlação com o grau histológico, visto que a maioria dos tumores com maior diâmetro inferior a 3cm foram de grau I neste estudo (Tabela 7).

Tabela 7: Correlação entre grau, idade e tamanho tumoral.

		Grau			
Parâmetro		I	II	III	Subtotal
Idade (anos)	≤ 10	n = 33 (71,7%) IC (56,3% à 83,5%)	n = 12 (26,1%) IC (14,7% à 41,4%)	n = 1 (2,2%) IC (0,1% à 13,0%)	n = 46 (100%)
	> 10	n = 30 (51,7%) IC (38,3% à 64,9%)	n = 24 (41,4%) IC (28,9% à 55,0%)	n = 4 (6,9%) IC (2,2% à 17,5%)	n = 58 (100%)
	p valor	0,06	0,15	0,51	
Tamanho Tumoral	< 3	n = 50 (69,4%) IC (57,3% à 79,4%)	n = 19 (26,3%) IC (17,0% à 38,3%)	n = 3 (04,1%) IC (01,0% à 12,5%)	n = 25 (100%)
	≥ 3	n = 8 (32,0%) IC (15,7% à 53,5%)	n = 15 (60,0%) IC (38,8% à 78,1%)	n = 2 (08,0%) IC (01,3% à 27,5%)	n = 72 (100%)
	p valor	0,002	0,005	0,824	

Legenda: n: número de animais, IC: intervalo de confiança, p: nível de significância estabelecido por teste Qui-Quadrado.

Foram também avaliados os linfonodos sentinela removidos durante a excisão cirúrgica. Dos 129 pacientes avaliados, 34 (26,3%) tiveram linfonodos sentinela avaliados. Destes 34 linfonodos, 6 (17,6%) tinham células metastáticas e 28 (82,3%) não apresentavam metástase.

Os tumores de grau III apresentaram maior grau de necrose, infiltração linfocitária, invasão linfática, desmoplasia e microcalcificação que os tumores de grau I e II, conforme demonstrado na Tabela 8. Entre todos os parâmetros avaliados a ausência de necrose, infiltração linfocíticas, invasão linfática, desmoplasia e microcalcificação foram estatisticamente significantes nos tumores de grau I e a invasão linfática teve

significância estatística na correlação com os graus histológicos I, II e III, sendo ausente nos tumores de grau I e presente nos tumores de grau III.

Tabela 8: Correlação entre o grau tumoral e parâmetros relacionados ao prognóstico.

		Grau		
Parâmetro		I	II	III
Necrose	A	n = 38 (56%) IC (44,0% à 68,5%)	n = 10 (27%) IC (14,3% à 44,3%)	n = 0 (%) IC (00,0% à 53,7%)
	+	n = 19 (28%) IC (18,3% à 40,8%)	n = 7 (18%) IC (08,5% à 35,7%)	n = 0 (%) IC (00,0% à 53,7%)
	++	n = 6 (08%) IC (03,6% à 19,1%)	n = 9 (24%) IC (12,3% à 41,5%)	n = 2 (40%) IC (07,2% à 82,9%)
	+++	n = 4 (05%) IC (01,9% à 15,3%)	n = 11 (29%) IC (16,4% à 47,1%)	n = 3 (60%) IC (17,0% à 92,7%)
	Subtotal	n = 67 (100%)	n = 37 (100%)	n = 5 (100%)
	p valor	0,000	0,738	0,066
Infiltração linfocítica	A	n = 6 (08,9%) IC (03,6% à 19,1%)	n = 3 (08,1%) IC (02,1% à 23,0%)	n = 0 (,%) IC (00,0% à 53,7%)
	+	n = 39 (58,2%) IC (45,5% à 69,9%)	n = 16 (43,2%) IC (27,5% à 60,3%)	n = 0 (,%) IC (00,0% à 53,7%)
	++	n = 16 (23,8%) IC (14,6% à 36,1%)	n = 13 (35,1%) IC (20,7% à 52,5%)	n = 2 (40,0%) IC (07,2% à 82,9%)
	+++	n = 6 (08,9%) IC (03,6% à 19,1%)	n = 5 (13,5%) IC (05,0% à 29,5%)	n = 3 (60,0%) IC (17,0% à 92,7%)
	Subtotal	n = 67 (100%)	n = 37 (100%)	n = 5 (100%)
	p valor	0,000	0,001	0,066
Invasão linfática	A	n = 67 (100%) IC (93,2% à 100%)	n = 31 (83,7%) IC (67,3% à 93,2%)	n = 1 (20,0%) IC (01,0% à 70,1%)
	P	n = 0 (0%) IC (00,0% à 06,7%)	n = 6 (16,2%) IC (06,7% à 32,6%)	n = 4 (80,0%) IC (29,8% à 98,9%)
	Subtotal	n = 67 (100%)	n = 37 (100%)	n = 5 (100%)
	p valor	0,000	0,000	0,000
Desmoplasia	A	n = 34 (50,7%) IC (38,3% à 63,0%)	n = 17 (45,9%) IC (29,8% à 62,8%)	n = 0 (,%) IC (00,0% à 53,7%)
	+	n = 19 (28,3%) IC (18,3% à 40,8%)	n = 9 (24,3%) IC (12,3% à 41,5%)	n = 3 (60,0%) IC (17,0% à 92,7%)
	++	n = 12 (17,9%) IC (09,9% à 29,5%)	n = 9 (24,3%) IC (12,3% à 41,5%)	n = 1 (20,0%) IC (01,0% à 70,1%)
	+++	n = 2 (02,9%) IC (00,5% à 11,3%)	n = 2 (05,4%) IC (00,9% à 19,5%)	n = 1 (20,0%) IC (01,0% à 70,1%)
	Subtotal	n = 67 (100%)	n = 37 (100%)	n = 5 (100%)
	p valor	0,000	0,001	0,167
Microcalcificação	A	n = 65 (97,0%) IC (88,6% à 99,4%)	n = 29 (78,3%) IC (61,3% à 89,5%)	n = 5 (100%) IC (46,2% à 100%)
	+	n = 2 (02,9%) IC (00,5% à 11,3%)	n = 6 (16,2%) IC (06,7% à 32,6%)	n = 0 (,%) IC (00,0% à 53,7%)
	++	n = 0 (,%) IC (00,0% à 06,7%)	n = 2 (05,4%) IC (00,9% à 19,5%)	n = 0 (,%) IC (00,0% à 53,7%)
	Subtotal	n = 67 (100%)	n = 37 (100%)	n = 5 (100%)
	p valor	0,000	0,000	0,001

Legenda: A: ausência de marcação, n: número de animais, IC: intervalo de confiança, p: nível de significância estabelecido por teste Qui-Quadrado.

Os painéis de expressão protéica evidenciaram correlação entre grau histológico e expressão de Ki-67, HER-2, COX-2, p63, vimentina e e-caderina (Tabela 9).

Tabela 9: Correlação entre o grau histológico e os marcadores moleculares Ki-67, HER-2, COX-2, P63, vimentina e e-caderina.

		Grau		
Parâmetro		I	II	III
Ki-67	Baixo ($\leq 10\%$)	n = 31 (46,2%) IC (00,5% à 11,3%)	n = 18 (48,6%) IC (06,7% à 32,6%)	n = 0 (00,0%) IC (00,0% à 53,7%)
	Interm. (11-24%)	n = 25 (37,3%) IC (00,0% à 06,7%)	n = 9 (24,3%) IC (00,9% à 19,5%)	n = 0 (00,0%) IC (00,0% à 53,7%)
	Alto ($\geq 25\%$)	n = 11 (16,4%) IC (88,6% à 99,4%)	n = 10 (27,0%) IC (61,3% à 89,5%)	n = 5 (100%) IC (46,2% à 100%)
	Subtotal	n = 67 (100%)	n = 37 (100%)	n = 5 (100%)
	p valor	0,001	0,052	0,001
HER-2	Negativo	n = 18 (26,8%) IC (17,1% à 39,3%)	n = 10 (27,0%) IC (14,3% à 44,3%)	n = 1 (20%) IC (1,0% à 70,1%)
	Positivo	n = 49 (73,1%) IC (17,1% à 39,3%)	n = 27 (72,9%) IC (14,3% à 44,3%)	n = 4 (80,0%) IC (29,8% à 98,9%)
	Subtotal	n = 67 (100%)	n = 37 (100%)	n = 5 (100%)
	p valor	0,000	0,000	0,206
COX-2	0	n = 4 (05,9%) IC (01,9% à 15,3%)	n = 1 (02,7%) IC (00,1% à 15,8%)	n = 0 (,%) IC (00,0% à 53,7%)
	+	n = 31 (46,2%) IC (34,1% à 58,8%)	n = 13 (35,1%) IC (20,7% à 52,5%)	n = 1 (20,0%) IC (01,0% à 70,1%)
	++	n = 30 (44,7%) IC (32,7% à 57,3%)	n = 14 (37,8%) IC (22,9% à 55,2%)	n = 1 (20,0%) IC (01,0% à 70,1%)
	+++	n = 2 (02,9%) IC (00,5% à 11,3%)	n = 9 (24,3%) IC (12,3% à 41,5%)	n = 3 (60,0%) IC (17,0% à 92,7%)
	Subtotal	n = 67 (100%)	n = 37 (100%)	n = 5 (100%)
	p valor	0,000	0,002	0,167
P63	Negativo	n = 29 (43,2%) IC (31,4% à 55,9%)	n = 15 (40,5%) IC (25,1% à 57,8%)	n = 4 (80,0%) IC (29,8% à 98,9%)
	Positivo	n = 38 (56,7%) IC (44,0% à 68,5%)	n = 22 (59,4%) IC (42,1% à 74,8%)	n = 1 (20,0%) IC (01,0% à 70,1%)
	Subtotal	n = 67 (100%)	n = 37 (100%)	n = 5 (100%)
	p valor	0,167	0,163	0,206
Vimentina	+	n = 6 (08,9%) IC (03,6% à 19,1%)	n = 1 (02,7%) IC (00,1% à 15,8%)	n = 0 (0%) IC (00,0% à 53,7%)
	++	n = 26 (38,8%) IC (27,3% à 51,5%)	n = 10 (27,0%) IC (14,3% à 44,3%)	n = 0 (0%) IC (00,0% à 53,7%)
	+++	n = 28 (41,7%) IC (30,0% à 54,4%)	n = 18 (48,6%) IC (32,2% à 65,3%)	n = 4 (80,0%) IC (29,8% à 98,9%)
	++++	n = 7 (10,4%) IC (04,6% à 20,9%)	n = 8 (21,6%) IC (10,4% à 38,6%)	n = 1 (20,0%) IC (01,0% à 70,1%)
	Subtotal	n = 67 (100%)	n = 37 (100%)	n = 5 (100%)
	p valor	0,000	0,000	0,009
E- caderina	1	n = 32 (47,7%) IC (35,5% à 60,2%)	n = 19 (51,3%) IC (34,6% à 67,7%)	n = 2 (40,0%) IC (07,2% à 82,9%)
	2	n = 16 (23,8%) IC (14,6% à 36,1%)	n = 6 (16,2%) IC (06,7% à 32,6%)	n = 1 (20,0%) IC (01,0% à 70,1%)
	3	n = 19 (28,3%) IC (18,3% à 40,8%)	n = 12 (32,4%) IC (18,5% à 49,8%)	n = 2 (40,0%) IC (07,2% à 82,9%)
	Subtotal	n = 67 (100%)	n = 37 (100%)	n = 5 (100%)
	p valor	0,008	0,006	0,741

Legenda: n: número de animais, IC: intervalo de confiança, p: nível de significância estabelecido por teste Qui-Quadrado.

De acordo com a marcação do Ki-67, os tumores de grau I apresentam menor índice de proliferação que os tumores de grau III com significância estatística. Os resultados revelaram que 46,2% dos tumores de grau I apresentaram baixo índice de proliferação, enquanto 37,3% e 16,4% apresentaram índices intermediários e de alta proliferação, respectivamente. A porcentagem de tumores de grau II com baixa, média e alta taxa de proliferação foram 48,6%, 24,3% e 27%, respectivamente. Cem por cento dos tumores de grau III apresentaram alto índice de proliferação com significância estatística.

Figura 2: Exemplos de porcentagem de marcação de Ki-67 elevada (A), intermediária (B) e baixa (C) – aumento de 20x.

A porcentagem de marcação do HER-2, embora com significância estatística nos graus I e II não permitiu correlação com os graus associados a pior prognóstico visto que foi positiva nos tumores de grau I, II e III.

Figura 3: Exemplos de porcentagem de marcação de HER-2 positiva (A) e negativa (B) – aumento de 20x.

A expressão de COX-2 foi maior em tumores de grau III, embora sem significância estatística. Nos tumores de grau I a expressão variou significativamente sendo zero em 5,9%, (1+) em 46,2%, (2+) em 44,7% e (3+) em 2,9% dos tumores. Nos tumores grau II a expressão variou de forma significativa sendo zero em 2,7%, (1+) em 35,1%, (2+) em 37,8% e (3+) em 24,3% dos tumores. A expressão em tumores grau III foi de (1+) em 20%, (2+) em 20% e (3+) em 60% das neoplasias.

Figura 4: Exemplos de porcentagem de marcação de COX-2 elevada (A), intermediária (B) e ausente (C)- aumento de 20x.

A expressão do p63 foi maior nos graus I e II em relação aos tumores de grau III. A marcação de P63 foi negativa em 43,2% dos tumores grau I. A expressão em tumores de grau II foi negativa em 40,5% e negativa em 80% dos tumores de grau III. Não houve significância estatística na correlação entre os graus histológicos e a marcação do p63.

Figura 5: Exemplos de porcentagem de marcação de p63 positiva nas células tumorais (A) e negativa nas células tumorais, sendo positiva apenas nas células da camada basal (B) – aumento de 20x.

A expressão de vimentina foi maior em tumores de grau III. A expressão em tumores de grau I foi (1+) em 8,9%, (2+) em 38,8%, (3+) em 41,7% e (4+) em 10,4%. A expressão em tumores de grau II foi (1+) em 2,7%, (2+) em 27%, (3+) em 48,6% e (4+) em 21,6%. No grau III, a expressão foi (3+) em 80% e (4+) em 20% dos tumores. Os resultados de correlação entre os graus e a expressão de vimentina foram significantes e evidenciaram maior marcação nos tumores de grau III.

Figura 6: Exemplos de porcentagem de marcação de vimentina elevada (A), intermediária (B) e baixa (C)- aumento de 20x.

A porcentagem de marcação da e-caderina não evidenciou diferença nos diferentes graus tumorais, havendo um padrão de marcação semelhante entre os graus histológicos.

Figura 7: Exemplos de porcentagem de marcação de e-caderina positiva (A) e negativa (B) – aumento de 20x.

Considerando os tipos histológicos mais agressivos, como carcinomas sólidos e anaplásicos e carcinosarcoma, observou-se, embora sem significância estatística, que a maioria deles eram de graus II e III. Quanto a correlação com os marcadores de imunohistoquímica, evidenciou-se que 80% de carcinomas sólidos, 66% de carcinomas anaplásicos e 66% de carcinosarcomas apresentaram alto índice de proliferação pelo Ki67. Os demais marcadores não permitiram a associação significativa com os subtipos histológicos (Tabela 10).

Tabela 10: Correlação entre os tipos histológicos mais agressivos e os marcadores Ki-67, HER-2, COX-2, P63, vimentina e e-caderina.

		Tipo Histológico		
Parâmetro		Carcinoma sólido	Carcinoma anaplásico	Carcinossarcoma
Grau	I	n = 1 (11%)	n = 0 (00%)	n = 0 (%)
		IC (00,5% à 49,3%)	IC (00,0% à 53,7%)	IC (00,0% à 69,0%)
	II	n = 6 (66%)	n = 4 (80%)	n = 2 (66%)
		IC (30,9% à 90,9%)	IC (29,8% à 98,9%)	IC (12,5% à 98,2%)
	III	n = 2 (22%)	n = 1 (20%)	n = 1 (33%)
	IC (03,9% à 59,8%)	IC (01,0% à 70,1%)	IC (01,7% à 87,4%)	
	Subtotal	n = 9 (100%)	n = 5 (100%)	n = 3 (100%)
	p valor	0,030	0,020	0,223
Ki-67	Baixo (≤ 10%)	n = 0 (%)	n = 1 (11%)	n = 0 (%)
		IC (00,0% à 53,7%)	IC (00,5% à 49,3%)	IC (00,0% à 69,0%)
	Interm. (11-24%)	n = 1 (20%)	n = 2 (22%)	n = 1 (33%)
		IC (01,0% à 70,1%)	IC (03,9% à 59,8%)	IC (01,7% à 87,4%)
	Alto (≥ 25%)	n = 4 (80%)	n = 6 (66%)	n = 2 (66%)
	IC (29,8% à 98,9%)	IC (30,9% à 90,9%)	IC (12,5% à 98,2%)	
	Subtotal	n = 5 (100%)	n = 9 (100%)	n = 3 (100%)
	p valor	0,020	0,030	0,223
HER-2	Negativo	n = 2 (40,0%)	n = 3 (33,3%)	n = 1 (33,3%)
		IC (07,2% à 82,9%)	IC (09,0% à 69,0%)	IC (01,7% à 87,4%)
	Positivo	n = 3 (60,0%)	n = 6 (66,6%)	n = 2 (66,6%)
		IC (17,0% à 92,7%)	IC (30,9% à 90,9%)	IC (12,5% à 98,2%)
	Subtotal	n = 5 (100%)	n = 9 (100%)	n = 3 (100%)
	p valor	1	0,346	1
COX-2	0	n = 0 (%)	n = 0 (%)	n = 0 (%)
		IC (00,0% à 53,7%)	IC (00,0% à 37,1%)	IC (00,0% à 69,0%)
	+	n = 1 (20%)	n = 3 (33%)	n = 1 (33%)
		IC (01,0% à 70,1%)	IC (09,0% à 69,0%)	IC (01,7% à 87,4%)
	++	n = 0 (%)	n = 4 (44%)	n = 1 (33%)
		IC (00,0% à 53,7%)	IC (15,3% à 77,3%)	IC (01,7% à 87,4%)
	+++	n = 4 (80%)	n = 2 (22%)	n = 1 (33%)
	IC (29,8% à 98,9%)	IC (03,9% à 59,8%)	IC (01,7% à 87,4%)	
	Subtotal	n = 5 (100%)	n = 9 (100%)	n = 3 (100%)
	p valor	0,009	0,159	0,721
P63	Negativo	n = 4 (80%)	n = 4 (44%)	n = 2 (66%)
		IC (29,8% à 98,9%)	IC (15,3% à 77,3%)	IC (12,5% à 98,2%)
	Positivo	n = 1 (20%)	n = 5 (55%)	n = 1 (33%)
		IC (01,0% à 70,1%)	IC (22,6% à 84,6%)	IC (01,7% à 87,4%)
	Subtotal	n = 5 (100%)	n = 9 (100%)	n = 3 (100%)
	p valor	0,206	1	1
Vimentina	+	n = 0 (%)	n = 0 (%)	n = 0 (%)
		IC (00,0% à 53,7%)	IC (00,0% à 37,1%)	IC (00,0% à 69,0%)
	++	n = 1 (2%)	n = 2 (22%)	n = 0 (%)
		IC (01,0% à 70,1%)	IC (03,9% à 59,8%)	IC (00,0% à 69,0%)
	+++	n = 1 (2%)	n = 5 (55%)	n = 1 (33%)
		IC (01,0% à 70,1%)	IC (22,6% à 84,6%)	IC (01,7% à 87,4%)
	++++	n = 3 (6%)	n = 2 (22%)	n = 2 (66%)
	IC (17,0% à 92,7%)	IC (03,9% à 59,8%)	IC (12,5% à 98,2%)	
	Subtotal	n = 5 (100%)	n = 9 (100%)	n = 3 (100%)
	p valor	0,167	0,056	0,180
E-caderina	1	n = 1 (20%)	n = 4 (44%)	n = 0 (%)
		IC (01,0% à 70,1%)	IC (15,3% à 77,3%)	IC (00,0% à 69,0%)
	2	n = 2 (40%)	n = 1 (11%)	n = 0 (%)
		IC (07,2% à 82,9%)	IC (00,5% à 49,3%)	IC (00,0% à 69,0%)
	3	n = 2 (40%)	n = 4 (44%)	n = 3 (%)
		IC (07,2% à 82,9%)	IC (15,3% à 77,3%)	IC (30,9% à 00,0%)
	Subtotal	n = 5 (100%)	n = 9 (100%)	n = 3 (100%)
	p valor	0,741	0,223	0,011

Legenda: n: número de animais, IC: intervalo de confiança, p: nível de significância estabelecido por teste Qui-Quadrado.

Como o presente estudo teve acesso apenas às amostras parafinadas dos tumores ressecados cirurgicamente, não foi possível fazer correlação com a história clínica e evolução da doença em todos os cães. Onze cães tiveram seus dados de prontuário disponibilizados, conforme descrito nas tabelas 11 e 12, porém não foi possível a correlação significativa dos dados com os resultados deste trabalho.

Tabela 11: Avaliação histopatológica e imuno-histoquímica dos pacientes.

Paciente	Tipo histológico	Grau	Ki-67	COX-2	HER-2	P63	E-caderina	Vimentina
1	Carcinoma sólido	II	3+	4+	-	-	3+	3+
2	Carcinoma ductal	I	3+	4+	-	+	1+	3+
3	Carcinoma em tumor misto	I	3+	2+	-	-	1+	4+
4	Carcinoma complexo	II	3+	3+	-	+	1+	2+
5	Carcinoma em tumor misto	I	3+	1+	-	+	2+	4+
6	Carcinoma em tumor misto	I	3+	1+	-	+	2+	4+
7	Carcinoma complexo	II	1+	1+	-	-	2+	4+
8	Adenose	-	1+	0	-	+	1+	1+
9	Carcinoma em tumor misto	II	3+	4+	-	-	3+	2+
10	Adenose	-	1+	0	-	-	1+	2+
11	Carcinoma complexo	II	2+	3+	-	+	1+	2+

Tabela 12: Dados clínicos dos pacientes.

Paciente	Metástase em linfonodo	Tratamento	Desfecho clínico
1	Presente (inguinal e axilar)	Cirurgia + quimioterapia	Sobrevida de 2 anos
2	Presente (inguinal)	Cirurgia + quimioterapia	Perda do seguimento após 2 anos
3	Ausente	Cirurgia + quimioterapia	Perda de seguimento após 4 meses
4	Ausente	Cirurgia + quimioterapia	Recidiva local após 1 ano. Metástase pulmonar após 2 anos. Sobrevida de 2,5 anos
5	Ausente	Cirurgia	Perda de seguimento após 2 meses
6	Ausente	Cirurgia	Perda de seguimento após 5 meses
7	Presente (inguinal e axilar)	Cirurgia + quimioterapia	Perda de seguimento após 5 meses
8	Ausente	Cirurgia	Perda de seguimento após 3 anos
9	Ausente	Cirurgia + quimioterapia	Perda de seguimento após 3 anos
10	Ausente	Cirurgia	Perda de seguimento após 4 meses
11	Presente (inguinal)	Cirurgia + quimioterapia	Metástase em linfonodo ilíaco após 6 meses. Perda de seguimento após 6 meses.

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

O presente trabalho permitiu a observação de divergências entre os resultados histopatológicos e imuno-histoquímicos relacionados ao prognóstico das neoplasias mamárias em cadelas. Este dado mostrou a necessidade de associação destas duas ferramentas diagnósticas para melhor predição do comportamento dos tumores de mama.

Alguns estudos mostraram que metade dos tumores removidos cirurgicamente em cadelas eram malignos (Sorenmo, 2003 Sleenckx et al, 2011). Outros pesquisadores relataram em seus estudos que apenas 19% dos tumores mamários eram benignos e 81% eram malignos (Simeonov e Stoikov, 2006). Tavasoly et al (2013) relataram que todas as amostras (n = 37) eram malignas. Shafiee et al (2013) revelaram que 13,3% dos tumores mamários em cadelas eram benignos e 86,7% malignos. Em nosso estudo, 20 (15,4%) dos tumores mamários eram lesões não neoplásicas ou benignos e 109 (84,5%) malignos.

Os resultados de Tavasoly et al (2013) mostraram que o tipo histológico mais comum foi o carcinoma simples (56,8%, n = 21), seguido do carcinoma complexo (13,5%, n = 5). Rezaie et al (2009) descreveram que 70,6% das cadelas possuíam carcinoma tubulopapilar, 23,5% de carcinoma sólido e 5,9% de carcinoma cribriforme. Ezerskyte et al (2011) indicaram que os tipos histológicos mais comuns em cães foram carcinoma simples, complexo e carcinossarcoma, com 46,0%, 27,0% e 13,0%, respectivamente. Shafiee et al (2013) estabeleceram que o tumor de mama mais frequente foi o carcinoma complexo (33,3%), seguido dos carcinomas em tumores

mistos (20%), carcinoma simples (6,7%) e hiperplasia cística (6,7%). Um estudo brasileiro mostrou predominância de carcinomas tubulares simples (42,7%), seguidos por carcinomas complexos (30%) e carcinoma em tumor mistos (10%) (Biondi et al, 2014). Em nosso estudo, o tipo histológico mais comum foi o carcinoma em tumor mistos, representando 34 (31,2%) das neoplasias malignos, seguido do carcinoma complexo 21 (19,2%) e carcinoma tubular 16 (12,4%).

Devido à diversidade dos critérios de classificação e graduação histológica em diferentes estudos, é muito difícil comparar o valor prognóstico da classificação histopatológica em tumores mamários caninos. Os estudos que associam a sobrevivência e a classificação histopatológica definem que cães com tumores de grau II e III têm uma taxa de sobrevivência menor do que aqueles com tumores de grau I (Shafie et al, 2013; Biondi et al, 2014). Corroborando tal fato, nosso estudo mostrou que os tumores de grau II e III apresentaram um painel imuno-histoquímico relacionado ao pior prognóstico.

A média de idade ao diagnóstico ($9,8 \pm 2,7$ anos) foi semelhante à encontrada na maioria dos artigos associados a tumores das glândulas mamárias que mencionam a predisposição de cadelas de meia idade e idosas (Biondi et al, 2014; Peña et al, 2013; Sleenckx et al, 2011).

Considerando a distribuição de raças caninas, estudos revelam resultados muito variáveis de frequência do carcinoma mamário nas diferentes raças. Biondi et al (2014) mostraram que as raças mais afetadas por tumores de mama em Santos, no Brasil, eram Cocker Spaniel, Boxer, Poodle, Pinscher, Labrador e Dachshund, corroborando os resultados deste trabalho.

O tamanho dos tumores está associado ao prognóstico segundo muitos trabalhos. Chang et al (2005) e Yamagami (1996) descreveram prognóstico mais favorável para cadelas com tumores menores que 5 cm. Peña et al (2013) e Santos et al (2013) mostraram que as cadelas com tumores maiores que 3 cm tinham pior prognóstico. De acordo com a análise histopatológica do presente trabalho, a maioria dos tumores menores que 3 cm eram de graus I e II com significância estatística, confirmando a associação entre tamanho inferior a 3 cm e melhor prognóstico descrita na literatura. Não houve diferença significativa na correlação entre tamanho e os tumores de grau III. Sugere-se que tal fato seja explicado pela amostra pequena, visto que os tumores de grau III são mais raros, representando apenas 5 dos 109 tumores malignos analisados neste estudo.

A análise dos linfonodos sentinela é de importância prognóstica e terapêutica em pacientes humanos e caninos com tumores malignos (Viale et al, 1999; Cserni, 2000; Wong et al, 2001). Este estudo mostrou que a maioria dos animais submetidos a mastectomia não teve os seus linfonodos removidos durante a cirurgia (74,7%), mostrando a necessidade de maior disseminação da importância da remoção de linfonodos sentinela na abordagem do câncer de mama.

A histopatologia permite análises de parâmetros morfológicos que podem estar relacionadas ao comportamento tumoral mais agressivo, como presença de necrose, infiltração linfocítica, invasão linfática, desmoplasia e microcalcificações (Ferreira et al, 2003). Neste estudo os tumores com graduação maior apresentaram os parâmetros morfológicos associados a pior prognóstico como descrito na literatura, exceto a microcalcificação que apresentou um padrão de ocorrência semelhante nos tumores de graus I, II e III. Houve significância estatística na correlação dos parâmetros

morfológicos analisados e o grau I e uma tendência à significância nos tumores de grau III, marcada por valores de p próximos a 0,05.

A análise imuno-histoquímica utilizou a técnica de *Tissue Microarray* que, embora não permita a análise integral do tecido tumoral, possui o benefício de reduzir os custos e tempo das análises. Vários trabalhos validam esta técnica para marcadores de imuno-histoquímica (Camp et al, 2000; Glajcar et al, 2013; Choi et al, 2005; Silva et al, 2016). Na Medicina, a técnica já é utilizada na rotina, possibilitando que um número maior de pacientes se beneficiem do valor prognóstico e preditivo das análises imuno-histoquímicas. Na Medicina Veterinária, o custo das análises moleculares dos tumores ainda é fator limitador para muitos proprietários. Por este motivo, os resultados deste trabalho auxiliam na validação da técnica de *Tissue Microarray* para os tumores mamários de cadelas.

De acordo com a análise imuno-histoquímica, os tumores de grau III apresentaram um padrão de marcação protéica compatível com pior prognóstico. No entanto, muitos tumores de grau I mostraram um painel protéico compatível com pior prognóstico, mostrando as limitações da tomada de decisão clínica baseada apenas na histopatologia.

Nos cães, observou-se resultados semelhantes aos descritos em mulheres em termos de aumento da expressão de Ki-67 em tumores mamários malignos, particularmente em cânceres menos diferenciados (Cassali, 2000). No presente estudo, houve maior expressão de Ki67 nos tumores de grau III do que nos tumores de grau I e II, com significância estatística e corroborando Rezaie et al (2011). Embora este trabalho apresente resultados semelhantes aos observados na literatura, a presença de alto índice mitótico em 16,4% dos tumores de grau I mostra a limitação da

histopatologia na predição do comportamento. Por isso, a decisão sobre quimioterapia adjuvante e neoadjuvante deve ser baseada também na determinação de Ki-67.

No câncer de mama humano, a expressão de HER2 é usada como fator prognóstico e preditivo e sua superexpressão correlaciona-se com características clínico-patológicas agressivas, como desenvolvimento de metástases, sensibilidade a terapias sistêmicas específicas e resistência a medicamentos (Burstein, 2005; Yamauchi et al, 2001) . Nos cães, o significado da superexpressão de HER2 não está claro nos tumores mamários. Estudos sobre a expressão de HER2 não foram consensuais, com taxas de superexpressão variáveis em tumores malignos (Gama et al, 2008; Im et al, 2013; Sassi et al, 2010). Além disso, não há acordo quanto ao seu valor prognóstico (Hsu et al, 2009; Ressel et al, 2013, Peña et al, 2014). No presente estudo, a porcentagem de amostras positivas para HER-2 nos graus I, II e III foi de 66,6%, 60% e 66,6%, respectivamente e com significância estatística apenas nos graus I e II. A marcação imuno-histoquímica de HER-2 tem uma característica peculiar, a heterogeneidade por diversidade subclonal das células tumorais (Vance et al, 2009). Assim, o uso da técnica (TMA) pode ter limitado a interpretação dos resultados deste trabalho.

A ciclooxigenase-2 (COX-2) é um marcador potencial para o câncer de mama em mulheres e cães, pois sua expressão é maior em tumores de pior prognóstico. A alta expressão está correlacionada com a baixa taxa de sobrevivência global e, portanto, pior prognóstico (Lavalle et al, 2009; Cassali et al, 2013). Os estudos correlacionam a alta expressão de COX-2 com malignidade, aumento da capacidade proliferativa, diminuição da taxa de apoptose e neovascularização, fatores que aumentam o potencial metastático das células tumorais (Doré et al, 2003). No presente estudo, a marcação de

COX-2 foi maior nos tumores de grau III, corroborando dados da literatura que associam esse achado com malignidade, metástase, redução do tempo livre de doença e sobrevida geral em cães, embora não tenha havido significância estatística para este grau (Queiroga et al, 2005). Além disso, os diferentes níveis de expressão de COX-2 em tumores de grau I, II e III indicam benefícios na terapia com inibidores de COX-2.

A diminuição da marcação de p63 nas células mioepiteliais da camada basal está associada a pior prognóstico (Loljung et al, 2014). Neste estudo, a marcação p63 foi positiva em 2 (20%) de tumores de grau III e, respectivamente, 43 (59,4%) e 27 (56,7%) de grau I e II, corroborando Gama et al, 2003, embora não tenha havido significância estatística provavelmente pelo número amostral pequeno.

A perda de marcadores epiteliais e o ganho de marcadores mesenquimais foram observados em nosso estudo. Estes resultados indicam que o fenômeno de transição epitélio-mesenquimal ocorre no câncer de mama canino e pode ser correlacionado com a aquisição de malignidade, como motilidade celular, capacidade invasiva, resistência apoptótica e resistência a medicamentos (Kalluri et al, 2009; Yao et al, 2011). No presente estudo, maior expressão de vimentina foi associada a tumores de grau III com significância estatística e corroborando Yoshida et al 2014.

O consenso atual de diretrizes sobre diagnóstico e tratamento do carcinoma de mama canino revela que os carcinossarcomas e carcinomas sólidos e anaplásicos são tipos histológicos mais associados com pior prognóstico (Cassali et al, 2013 e Peña et al, 2014). Nosso estudo mostrou que esses tipos histológicos possuem um painel imuno-histoquímico relacionado a um pior prognóstico, embora o número pequeno de amostras possa ter limitado a significância estatística.

CONCLUSÃO

8. CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados deste estudo mostraram uma correlação entre os parâmetros histopatológicos e os marcadores imuno-histoquímicos no tumor de grau I, II e III. No entanto, alguns tumores de grau I podem apresentar um indicador de painel imuno-histoquímico de mau prognóstico e ser subestimados se apenas forem avaliados por histopatologia. Por esta razão, a definição de linhas de tratamento e o prognóstico baseados apenas na análise histopatológica é limitado e deve ser complementado por imuno-histoquímica.

Além disso, uma alta prevalência de tumores malignos mamários e a semelhança de tipos histológicos e perfis de coloração imuno-histoquímica qualificam a população canina como modelo promissor para estudos de câncer translacional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahern TE, Bird RC, Bird AE *et al.* Expression of the onco-gene c-erbB-2 in canine mammary cancers and tumor-derived cell lines. Am J Vet Res. 1996; 57: 693-6.

Al-Dhaheri WS, Hassouna I, Al-Salam S *et al.* Characterization of breast cancer progression in the rat. Annals of the New York Academy of Sciences. 2008; 1138: 121-31.

Benjamin SA, Lee AC, Saunders WJ. Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles. Vet Pathol. 1999; 36: 423-36.

Biondi LR, Gentile LB, Rego AAMS, Noronha NP, Dagli MLZ. Canine mammary tumors in Santos, Brazil: clinicopathological and survival profile. Braz J Vet Res. 2014, 51(3), 252-62.

Breen N, Gentleman JF, Schiller JS. Update on mammography trends: comparisons of rates in 2000, 2005, and 2008. Cancer. 2011; 117: 2209-18.

Brennan K, Offiah G, McSherry EA *et al.* Tight junctions: a barrier to the initiation and progression of breast cancer? J Biom Biotech. 2010; 2010.

Burnstein HJ. The distinctive nature of HER-2-positive breast cancers. N Engl J Med. 2005; 353: 1652-4.

Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest.* 2000; 80: 1943-9.

Cassali GD. Estudos morfológicos imunohistoquímicos e citométrico de tumores mamários da cadela- aspectos comparativos com neoplasias da mama humana. 73 f. (Doutorado) – Ciência Animal, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

Cassali GD, Lavalle GE, De Nardi AB *et al.* Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. *Braz J Vet Pathol* 2011; 4: 153-80.

Cassali GD, Lavalli GE, Ferreira E *et al.* Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. *Bras J Vet Pathol.* 2014, 7(2): 38-69.

Cavalcanti MF, Cassali GD. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas – revisão. *Rev Clin Vet.* 2006, 11: 56-64.

Claus EB, Schildkraut JM, Thompson WD *et al.* The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer. *Cancer.* 1997; 77: 2318-24.

Clemente M, Perez-Alenza MD, Illera JC *et al.* Histologic, immunologic and ultrastructural description of vasculogenic mimicry in canine mammary cancer. *Vet Pathol.* 2010; 47: 265-274.

Chang SC, Chang CC, Chang TJ, Wong ML. Prognostic factors associated with surgical two years after surgery in dogs with malignant mammary tumours: 79 cases (1998-2002). J Am Vet Med Assoc. 2005, 227(10), 1625-9.

Choi DH, Sung Kim MD, Rimm DL et al. Immunohistochemical biomarkers in patients with early-onset breast carcinoma by tissue microarray. J Cancer. 2005; 11(5): 404-411.

Chu LL, Rutteman GR, Kong JM *et al.* Genomic organization of the canine p53 gene and its mutational status in canine mammary neoplasia. Breast Cancer Res Treat. 1998; 50: 11-25.

Cohen D, Reif SS, Brodey RS. Epidemiological analysis of the most prevalent sites and types of canine neoplasia observed in a veterinary hospital. Can Res. 1974; 34: 2859-68.

Crosier M, Scott D, Wilson RG *et al.* Differences in Ki67 and c-erbB2 expression between screen-detected and true interval breast cancers. Clin Cancer Res. 1999; 5: 2682-8.

Cserni, G. Axillary staging of breast cancer and the sentinel node. J Clin Path. 2000, 53, 733-41.

De Nardi AB, Rodaski S, Sousa RS *et al.* Prevalência de neoplasias modalidade de tratamentos em cães, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. Archives of Veterinary Science. 2002; 7: 15-26.

Dewar R, Fadare O, Gilmore H et al. Best practices in diagnostic immunohistochemistry: myoepithelial markers in breast pathology. Arch Pathol Lab Med. 2011; 135: 422-29.

Dolle JM, Daling JR, White E *et al.* Risk factors for triple-negative breast cancer in women under the age of 45 years. Canc Epidemiology, Biomarkers and Prevention. 2009; 18: 1157-66.

Doré M, Lanthier I, Sioris J. Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors. Vet Pathol. 2003, 40, 207-12.

Dutra AP, Azevedo Junior GM, Schmitt FC, Cassali GD. Assesment of cell proliferation and prognostic factors in canine mammary gland tumors. Arq Bras Med Vet Zootec. 2008, 60: 1403-12.

Dutra AP, Granja NVM, Schmitt FC et al. C-erb-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. Braz J Med Biol Res. 2004; 37: 1673-81.

Eisenberg ALA, Koifman S. Câncer de mama: marcadores tumorais (revisão de literatura). Rev Bras Cancerol. 2001; 47: 377-88.

Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathol.* 1991, 19: 403-10.

Espinosa de los Monteros A, Millan MY, Ramirez GA et al. Expression of maspin in mammary gland tumors of the dog. *Vet Pathol.* 2005; 42: 250-7.

Estrela-Lima A, Araujo MSS, Costa-Neto JM et al. Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. *BMC Cancer.* 2010; 10: 1-14.

Ezerskyte A, Zamokas G, Grogonis A. The retrospective analysis of mammary tumors in dogs. *Vet Med Zoot.* 2011, 53(75), 3-8.

Fan X, Shi L, Fang H *et al.* DNA microarrays are predictive of cancer prognosis: a re-evaluation. *Clin Cancer Res.* 2010; 16: 629-36.

Fénichel P, Brucker-Davis F. Environmental endocrine disruptors and breast cancer: new risk factors? *Gynecologie, Obstetrique et Fertilité.* 2008; 36: 969-77.

Ferreira E, Bregunci GC, Schmitt FC, Cassali GD. Protocol for the anatomopathological examination of canine mammary tumors. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2003, 55: 105-09.

Ferreira E, Bertagnolli AC, Cavalcanti MF, Schmitt FC, Cassali GD. The relationship between tumor size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumors. *Vet Com Oncol*. 2009; 193: 1-6.

Fitzgibbons FL, Page DL, Weaver D *et al*. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Concensus Statement 1999. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2000; 124: 966-78.

Gama A, Alves A, Gartner F *et al*. A novel myoepithelial cell marker in canine mammary tissue. *Vet J*. 2011; 190: 303-304.

Gama A. P63: a novel myoepithelial cell marker in canine mammary tissues. *Vet Pathol*. 2003; 40: 412-40.

Gama A, Alves A, Schmitt F. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Arch*. 2008, 453: 123-32.

Glajcar A, Kaczmarczyk K, Szpor J *et al*. Application of tissue microarrays for receptor immunohistochemistry in breast carcinoma. *Folia Histochem Citox*. 2013; 51(4): 326-32.

Goldschmidt M, Pena L, Rasotto R *et al*. Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet Pathol*. 2011; 48: 117-31.

Graham JC, O'Keefe DA, Gelberg HB. Immunohistochemical assay for detecting estrogen receptors in canine mammary tumors. *Am J Vet Res.* 1999; 60: 627-30.

Haga S, Nakayama M, Tatsumi K. Overexpression of the p53 gene product in canine mammary gland tumors. *Oncol Rep.* 2001; 8: 1215-9.

Hahn KA, Richardson RC, Knapp DW. Canine malignant mammary neoplasia: biological behavior, diagnosis and treatment alternatives. *J Am Animal Hosp Assoc.* 1992, 28: 251-6.

Hemminki E, Kyyronen P, Pukkala E. Postmenopausal hormone drugs and breast and colon cancer: Nordic countries 1995–2005. *Maturitas.* 2008; 61: 299-304.

Horta RS, Costa MP, Lavalle GE et al. Prognostic and predictive factors of canine tumours defined with immunohistochemistry's assistance. *Ciência Rural.* 2012; 42(6): 1033-9.

Hsu WL, Huang HM, Liao JW 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. *Vet J.* 2009; 180: 116-23.

Hulka BS, Moorman PG. Breast cancer: hormones and other risk factors. *Maturitas.* 2001; 38: 103-13.

Hwang ES, De Vries S, Chew KL *et al.* Patterns of chromosomal alterations in breast

ductal carcinoma in situ. Clin Can Res. 2004; 10: 5160-7.

Im KS, Kim IH, Kim NH et al. Breed-related differences in altered BRCA-1 expression, phenotype and subtype in malignant canine mammary tumors. Vet J. 2013, 195, 366-72.

Jemal A, Siegel R, Ward E *et al.* Cancer statistics. CA: A Cancer J Clinicians. 2009; 59: 225-49.

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. J Clin Invest. 2009, 119, 1420-8.

Karangadan S, Patil AG, Andola SK. Immunohistochemical characterization of molecular classification of breast carcinoma and its relation with Ki-67. Clin Cancer Inv J. 2016, 5 (5), 430-36.

Karayannopoulou M, Kaldrymidou E, Constantinidis TC, Dessiris A. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. J Comp Pathol. 2005, 20, 1-7.

Kásler M, Polágr C, Fodor J. Current status of treatment for early-stage invasive breast cancer. Orvosi Hetilap. 2009; 150: 1013-21.

Kaufmann O, Fietze E, Mengs J et al. Value of p63 and cytokeratin 5/6 as immunohistochemical markers for the differential diagnosis of poorly differentiated and undifferentiated carcinomas. Am J Clin Pathol. 2001; 116: 823-30.

Kelsey JL, Gammon MD, John EM. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev.* 1993; 15: 36-47.

Kitchell BE. Mammary tumors. In: Bonagura JD, editor. *Kirk's current veterinary therapy XII small animal practice*. Philadelphia, PA: Saunders; 1995. p. 1098–103.

Kim NH, Lim HY, Im KS et al. Identification of triple-negative and basal-like canine mammary carcinomas using four basal markers. *J Comp Path.* 2013, 148, 298-306.

Klopfleish R, Lenze D, Hummel M *et al.* Metastatic canine mammary carcinomas can be identified by a gene expression profile that partly overlaps with human cancer profiles. *BMC Cancer.* 2010; 10: 618.

Kokkinos MI, Wafai R, Wong MK et al. Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer- observations in vitro and in vivo. *Cells Tissues Organs.* 2007; 185: 191-203.

Kurzman ID, Gilbertson SR. Prognostic factors in canine mammary tumors. *Seminars in Veterinary Medicine & Surgery (Small Animal).* 1986; 1: 25-32.

Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977, 33:159-174.

Lavalle GE, Bertagnolli AC, Tavares WLF, Cassali GD. Cox-2 expression in canine mammary carcinomas: correlation with angiogenesis and overall survival. *Vet pathol.* 2009, 46, 1275-80.

Lavalle GE, campos CB, Bertagnolli AC et al. Canine malignant mammary gland neoplasias with advanced clinical staging treated with carboplatin and cyclooxygenase inhibitors. *In Vivo.* 2012, 26: 375-9.

Ley TJ, Mardis ER, Ding L *et al.* DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature.* 2008; 456: 66-72.

Loljung L, Coates PJ, Nekulova M et al. High expression of p63 is correlated to poor prognosis in squamous cell carcinoma of the tongue. *J Oral pathol Med.* 2014, 43(1): 14-19.

Marconatto L, Lorenzo RM, Abramo F et al. Adjuvant gemcitabine after surgical removal of aggressive malignant mammary tumors in dogs. *Vet Comp Oncol.* 2008, 53: 203-7.

Martin de las Mulas J; Ordas J, Millan Y et al. Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Breast Cancer Res Treat.* 2003; 80: 363-367.

Martin PM, Cortard M, Mialot JP. Animal models for hormone dependent human breast cancer. *Cancer Chem Pharm.* 1984; 2: 13-7.

Merlo DF, Rossi L, Pellegrino C et al. Cancer incidence in pet dogs: findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. *J Vet Intern Med.* 2008; 22: 976-984.

Misdorp W, Cotchin E, Hampe JF et al. Canine malignant mammary tumours: I. Sarcomas. *Vet Pathol.* 1971; 8: 99-117.

Misdorp W, Cotchin E, Hampe JF et al. Canine malignant mammary tumours: II. Adenocarcinomas, solid carcinomas and spindle cell carcinomas. *Vet Pathol.* 1972; 9: 447-70.

Misdorp W, Cotchin E, Hampe JF et al. Canine malignant mammary tumours: III. Special types of carcinomas, malignant mixed tumours. *Vet Pathol.* 1973; 10: 241-56.

Misdorp W, Hart AA. Canine mammary cancer. Therapy and causes of death. *J Small Animal Practice.* 1979; 20: 395-404.

Misdorp W, Else RW, Hellmén E *et al.* Histological classification of the mammary tumours of the dog and the cat. Em: Shulman FI. World Health Organization International Histological Classification of Tumours of Domestic Animals. Second Series. Vol.7. Armed Forces Institute of Pathology, Washington DC; 1999: 16-29.

Morris JS. Improving the diagnosis and treatment of canine mammary tumours: immunohistochemical markers as prognostic tolls. *The Vet Journal.* 2010; 184: 3-4.

Mosunjac MB, Lewis MM, Lawson D et al. Use of a novel marker, calponin, for myoepithelial cells in fine-needle aspirates of papillary breast lesions. *Diagn Cytopathol.* 2000; 23: 151-55.

Mouser P, Miller MA, Antuofermo E Badve SS, Mohammed SI. Prevalence and classification of spontaneous mammary intraepithelial lesions in dogs without clinical mammary disease. *Vet Pathol.* 2010, 47(2), 275-84.

Neto A, Pérez-Alenza MD, Del Castillo N et al. BRCA-1 expression in canine mammary dysplasia and tumors: relationship with prognostic variables. *J Com Pathol.* 2003; 128: 260-8.

Nguyen F, Peña L, Ibich C et al. Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 1: natural history and prognostic factors. *Breast Cancer Res Treat.* 2017; 167 (3): 635-48.

Novosad CA. Principles of treatment for mammary gland tumors. *Clin Tech Small Animal Practice.* 2003; 18: 107-9.

Ochiai K, Morimatsu M, Tomizawa N *et al.* Cloning and sequencing full length of canine Brca2 and Rad51 CDNA. *J Vet Med Sci.* 2001; 63: 1103-8.

Ogilvie GK, Obradovich JE, Elmslie RE et al. Efficacy of mitoxantrone against various neoplasms in dogs. *J Am Animal Hosp Assoc.* 1991, 198: 1618-21.

Ogilvie GK, Reynolds HA, Richardson RC et al. Phase II evaluation of doxorubicin for treatment alternatives. J Am Animal Hosp Assoc. 1989, 195: 1580-3.

Oliveira CM. Expression of Her-2/Neu protein in mammary tumors of bitches. J Veter Inter Med. 2009; 23: 743.

Owen LN. The TNM classification of tumors in domestic animals. 1st ed. Geneva: World Health Organization; 1980.

Patsikas MN, Dessiris A. The lymph drainage of the neoplastic mammary glands in the bitch: a lymphographic study. Anat Hist Embry. 2006, 35: 228-34.

Peña LL, Nieto AI, Pérez-Alenza D *et al.* Immunohistochemical detection of Ki67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. J Vet Diagn Invest. 1998; 10: 237-46.

Peña L, Andres PJ, Clemente M, Cuesta P, Pérez-Alenza D. Prognostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with two-year follow-up: relationship with clinical and histological characteristics. Vet Pathol. 2013, 50, 94-105.

Peña LL, 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; 5: 127-145.

Peng Y, Butt YM, Chen B et al. Update on immunohistochemical analysis in breast lesions. Arch Pathol Lab Med. 2017; 141: 1033-51.

Perez-Alenza MD, Pena L, del Castillo N *et al.* Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. J Small Animal Practice. 2000; 41: 287-91.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. Nature. 2000; 406: 747-52.

Plackett RL. Karl Pearson and the Chi-Squared Test. Int Stat Rev. 1983; 51 (1): 59-72.

Poirier VJ, Hershey AE, Burgess KE et al. Efficacy and toxicity of paclitaxel (Taxol) for the treatment of canine malignant tumors. J Vet Int Med. 2004, 18: 219-22.

Polton G. Mammary tumors in dogs. Irish Vet J. 2009, 62 (1): 50-6.

Porrello A, Cardelli P, Spugnini EP. Oncology of companion animals as a model for humans. An overview of tumor histotypes. J Exper Clin Can Res. 2006; 25:1.

Queiroga FL, Perez-Alenza MD, Silvan G, Peña L et al. Cox2 levels in canine mammary tumors, including inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological features and prognostic significance. Anticancer Res. 2005, 25(6b), 4269-75.

Ravdin PM, Cronin KA, Howlader N *et al.* The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. *New England J Medicine*. 2007; 356: 1670-4.

Ressel L, Puleio R, Loria GR *et al.* Her-2 expression in canine morphologically normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissues and its correlation with the clinical outcome. *Res Vet Sci*. 2013; 94: 299-305.

Rew DA. DNA microarrays technology in cancer research. *Eur J Surg Oncol*. 2001; 27: 504-8.

Rezaie A, Tavasoli A, Bahonar A, Mehrazma M. Grading in canine mammary gland carcinoma. *J Biol Sci*. 2009, 9, 333-8.

Rezaie A, Tavasoli A, Mehrazma M, Bahonar A. Immuno-histochemical staining expression of Ki67 protein in canine mammary gland carcinoma. *Comp Clin Path*. 2011, 20(6), 557-61.

Rezaie A, Tavasoli A, Mehrazma M *et al.* C-erbB2 receptor and p53 protein expression in canine mammary gland carcinoma. *Comp Clin Pathol*. 2012; 21: 1633-36.

Ruiz FS, Alessi AC, Chagas CA *et al.* Immunohistochemistry in diagnostic veterinary pathology: a critical review. *J Bras Patol Med Lab*, 2005; 41 (4):263-70.

Santos AA, Lopes CC, Ribeiro JR, martins LR, Santos JC, Amorim IF, Gartner F, Matos AJ. Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. BMC Vet Res. 2013, 9.

Sassi F, Benazzi C, Castellani G et al. Molecular-based tumor subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immuno-histochemistry. BMC Vet Res. 2010, 6, 5.

Schlehe B, Schmutzler R. Hereditary breast cancer. Chirurg. 2008; 79: 1047-54.

Schneider R, Dorn C, Taylor D. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. J Nat Can Inst. 1969; 43: 1249-61.

Shafiee R, Javanbakht J, Atyabi N et al. Diagnosis, classification and grading of canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: an Clinico-Cytohstopathological study with environmental factors influencing public health and medicine. Cancer Cell International. 2013, 13:79, 01-11.

Siegel R, Ma J, Zou Z. Cancer Statistics. CA Cancer J Clin. 2014.

Silva FBF, Leite JS, Mello MFV et al. Validation of a low-cost modified technique for constructing tissue microarrays for canine mammary tumor analysis. Pathol Res and Pract. 2016; 212 (9): 783-90.

Simeonov R, Stoikov D. Study on the correlation between the cytological and histological tests in the disgnostic of canine spontaneous mammary neoplasms. Bulgarian J Vet Med. 2006, 9, 211-9.

Sleeckx HR, Kroeze EJBV, Ginneken CV, Brantegen LV. Canine mammary tumours, an overview. Reproduction in Domestic Animals, 2011, 46(6), 1112-31.

Sorenmo KU. Canine mammary gland tumours. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2003, 33: 573-96.

Sorenmo KU, Deanna RW, Goldsmidt RH. Tumors of the mammary gland. Withrow SJ, Vail DM. Withrow & Mac Ewen's small animal clinical oncology. 5^o Ed. Philadelphia: WB Sauners Company, 2013: 553-571.

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R *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. 2001; 98: 10869-74.

Sternlicht MD, Kedeshian P, Shao ZM, Safarians S, Barsky SH. The human myoepithelial cell is a natural tumor supressor. Clin Cancer Res. 1997, 3: 1949-58.

Stratmann N, Failing K, Richter A, Wehrend A. Mammary tumor recurrence in bitches after regional mastectomy. Vet Surg, 2008, 37: 82-86.

Tavasoly A, Golshahi H, Rezaie A, Farhadi M. Classification and grading of canine malignan mammary tumors. Vet Res Forum. 2013, 4(1), 25-30.

Tran CM, Moore AS, Frimberger AE. Surgical treatment of mammary carcinomas in dogs with or without postoperative chemotherapy. *Veterinary and Comparative Oncology*. 2014, 14 (3): 252-62.

Vance GH, Barry TS, Bloom KJ et al. Genetic heterogeneity in HER2 testing in breast cancer: panel summary and guidelines. *Arch Pathol Lab Med*. 2009, 133, 611-2.

Van't Veer LJ, Dai H, Van de Vijver *et al*. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002; 415: 530-6.

Vasconcellos CA, Sepúlveda BN, Pacheco CC. Presence of estrogen and progesterone receptors and CBG in the female tract of sheep and dogs: comparative immunochemistry study. *Int J Morphol*. 2006; 24 (3): 457-61.

Vastag B. Giving new meaning to the word watchdog. *J National Can Inst*. 1999; 91: 113-5.

Venkitaraman AR. Linking the cellular functions of BRCA genes to cancer pathogenesis and treatment. *Annu Rev Pathol*. 2009; 4: 461-87.

Viale G, Bosari S, Mazzarol G et al. Intraoperative examination of axillary sentinel lymph nodes in breast carcinoma patients. *Cancer*. 1999, 85, 2433–8.

Von EH Rivera P, Nyman H, Haggstrom J e Borga O. A dose-finding study with a novel water-soluble formulation of paclitaxel for the treatment of malignant high-grade solid tumours in dogs. *Vet Comp Oncol*. 2013, 11: 243-255.

Wong SL, Chao C, Edwards MJ et al. The use of cytokeratin staining in sentinel lymph node biopsy for breast cancer. *Am J Surg*. 2001, 182, 330-4.

Yamagami, T, Kobayashi LA, Takahashi K, Sugiyama M. Prognosis for canine malignant mammary tumours based on TNM and histologic classification. *J Vet Med Science*. 1996, 58(11), 1079-83.

Yamauchi H, Stearns V, Hayes DF. When is a tumor marker ready for prime time? A case study of c-erb-2 as a predictive factor in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2001; 19: 2334-56.

Yao D, Dai C, Peng S. Mechanism of mesenchymal-epithelial transition and its relationship with metastatic tumor formation. *Mol Cancer Res*. 2011, 9, 1608-20.

Yaziji H, Gown AM, Sneige N. Detection of stromal invasion in breast cancer: the myoepithelial markers. *Adv Anat Pathol*. 2000, 7: 100-109.

Yoshida K, Yoshida S, Choisunirachon N et al. The relationship between clinicopathological features and expression of epithelial and mesenchymal markers in spontaneous canine mammary gland tumors. *J Med Vet Sci*. 2014; 76(10): 1321-7.

Zar, J.H. Biostatistical Analysis, Fifth edition, PrenticeHall, Upper Saddle River, NJ.
2010.