



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SEROLÓGICOS DE HER-2 – RELEVÂNCIA CLÍNICA EM  
CADELAS COM TUMORES MAMÁRIOS MALIGNOS

MARTA ORNELAS DANTAS PEREIRA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor António José de Freitas Duarte

Doutor Mário António Pereira da Silva

Soares de Pinho

Doutor Fernando António da Costa Ferreira

ORIENTADOR

Doutor Fernando António da Costa

Ferreira

COORIENTADORA

Dra. Maria João da Costa Soares

2015

LISBOA

---





UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SEROLÓGICOS DE HER-2 – RELEVÂNCIA CLÍNICA EM  
CADELAS COM TUMORES MAMÁRIOS MALIGNOS

MARTA ORNELAS DANTAS PEREIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor António José de Freitas Duarte

Doutor Mário António Pereira da Silva

Soares de Pinho

Doutor Fernando António da Costa Ferreira

ORIENTADOR

Doutor Fernando António da Costa  
Ferreira

COORIENTADORA

Dra. Maria João da Costa Soares

2015

LISBOA

---

## **Dedicatória**

Aos meus pais, a quem devo tudo, e a quem pretendo um dia demonstrar que todos os seus esforços e apoio valeram a pena.



## Agradecimentos

Ao Professor Doutor Fernando Ferreira, por me ter proporcionado esta oportunidade de estágio, pela transmissão de conhecimentos em várias áreas do saber, pela sua simpatia, entusiasmo e humor, mas também pelos seus sábios conselhos. Sem dúvida que não podia ter pedido melhor orientador.

À Dra. Maria João Soares, que gentilmente aceitou ser coorientadora, e cujo papel foi imprescindível. Agradeço por me ter acompanhado no dia-a-dia e durante todo o estágio, seria impossível resumir nestas linhas todo o apoio e ajuda prestados. Resta dizer que sem a sua presença e empenho, certamente que tudo teria sido muito mais difícil. Um muito obrigado.

Às minhas queridas colegas de estágio e elementos da equipa HER-2, a Marta e a Angelina, às quais também deixo aqui um agradecimento especial. À Marta, pela amizade que desenvolvemos e por todos os bons momentos passados dentro e fora do período de estágio. À Angelina, pela enorme simpatia e amabilidade, e pelo facto de ter partilhado comigo dados e materiais essenciais para o desenvolvimento desta dissertação.

À Dra. Margarida Simões, sempre simpática e disponível para ajudar e esclarecer dúvidas.

Ao restante pessoal do CIISA e às técnicas de Anatomia Patológica (em especial a Dra. Sandra), que muito contribuíram para o ambiente de entreajuda e partilha de conhecimentos, e aos médicos do Hospital Escolar da FMV que me permitiram recolher amostras para este estudo.

A toda a minha família, porque a família é o mais importante que temos neste Mundo. À minha avó, grande exemplo de pessoa, que sei que está orgulhosa de mim. Às minhas tias e tios, pela motivação e interesse demonstrados ao longo do meu percurso académico.

Às minhas amigas, vocês sabem quem são, e ao Nuno. Tão essenciais e sem as quais não seria a mesma pessoa. Espero continuar a ter o privilégio de partilhar a minha vida convosco.

E porque os últimos também são os primeiros... aos meus pais, a quem dedico esta dissertação, e a ti minha Nicha (estás sempre no meu pensamento).



## Resumo

O cancro é das principais causas de morte nos animais domésticos. Além disso, muitas formas de neoplasia assemelham-se às suas homólogas nos humanos, em termos de comportamento biológico, expressão génica e fatores de risco.

À semelhança do cancro mamário na Mulher, os tumores mamários malignos caninos representam um grupo heterogéneo em termos morfológicos e biológicos. Adicionalmente, a grande importância dos tumores mamários caninos na medicina canina prende-se com o facto destes representarem a neoplasia mais comum nas fêmeas desta espécie.

É sabido que na espécie humana, aproximadamente 15–30% do total de cancros mamários sobre-expressam o recetor HER-2, conferindo-lhe uma maior agressividade e pior sobrevivência. A clivagem proteolítica do HER-2 (HER-2 *shedding*) gera moléculas solúveis formadas apenas pelo domínio extracelular (DEC) do recetor e cuja concentração pode ser quantificada no soro. Recentemente, os níveis séricos do DEC (sHER-2) têm sido propostos como um biomarcador para a determinação do *status* do HER-2 nos tumores mamários.

Na cadela, alguns estudos demonstraram que a sobre-expressão do HER-2 ocorre em 9,8–48% dos tumores mamários malignos. No entanto, as possíveis analogias em termos prognósticos e preditivos entre os padrões da sobre-expressão proteica na espécie canina e humana é um tema que só recentemente começou a ser estudado e que para o qual existem resultados controversos.

O objetivo deste estudo foi avaliar os níveis séricos de HER-2 (com base na quantificação do DEC) em cadelas com carcinoma mamário e estudar a associação destes níveis com diferentes variáveis clínico-patológicas, no sentido de investigar o potencial deste recetor como alvo terapêutico.

A expressão do HER-2 foi avaliada em vinte e cinco amostras de soro, através da técnica de *Dot Blot*. Quinze (60%) animais com tumores mamários malignos apresentaram níveis aumentados de sHER-2, mostrando associação positiva com o tamanho tumoral. Os resultados obtidos sugerem que, na espécie canina, níveis aumentados de sHER-2 se associam a algumas características tumorais mais desfavoráveis, como reportado no cancro mamário na Mulher e, que a possibilidade do uso de anticorpos anti-HER-2 em cadelas com tumores mamários que mostrem sobre-expressão de HER-2 deverá ser avaliada.

Palavras-chave: tumores mamários caninos; HER-2; sobre-expressão; sHER-2; *Dot Blot*.



## Abstract

Cancer is a major cause of death in domestic animals. Furthermore, many types of pet neoplasm resemble human counterparts in biological behavior, gene expression and risk factors.

Similarly to breast cancer in woman, canine malignant mammary tumors represent a heterogeneous group in terms of morphology and biology. Additionally, the great importance of canine mammary tumors in canine medicine it's due to the fact that these represent the most common neoplasm in females of this species.

It is known that in humans, approximately 15–30% of breast cancers overexpress the HER-2 receptor, which confers greater aggressiveness and a worse survival. HER-2 proteolytic cleavage (HER-2 shedding) generates soluble molecules that include only the extracellular domain (ECD) of the receptor and the concentration of which can be quantified in sera. Recently, serum ECD levels (sHER-2) have been proposed as a biomarker for the determination of the HER-2 status of breast tumors.

In the bitch, some studies have shown that HER-2 overexpression occurs in 9.8–48% of malignant mammary tumors; however, possible prognostic and predictive analogies between protein overexpression patterns in canine and human species is a topic that has only recently begun to be studied and for which there are conflicting results.

The aim of this study was to evaluate the serum levels of HER-2 (based on the quantification of ECD) in bitches with mammary carcinoma and to study the association between these levels and different clinicopathological variables, in order to investigate the potential of this receptor as a therapeutic target.

HER-2 expression was evaluated in twenty five serum samples, using the *Dot Blot* technique. Fifteen (60%) animals with malignant mammary tumors showed increased levels of sHER-2, which was positively associated with tumor size.

The results obtained suggest that, in canine species, increased levels of sHER-2 associate with some less favorable tumor features, as also reported for human breast cancer and that the possibility of using anti-HER-2 antibodies in bitches with HER-2 overexpressing mammary tumors should be investigated.

Keywords: canine mammary tumors; HER-2; overexpression; sHER-2; Dot Blot.



## Índice geral

Dedicatória.....	i
Agradecimentos .....	iii
Resumo .....	v
Abstract.....	vii
Índice geral .....	ix
Índice de figuras .....	xi
Índice de tabelas .....	xi
Índice de gráficos.....	xi
Lista de abreviaturas .....	xii
I. Revisão Bibliográfica.....	1
1. Revisão anatômica e histológica da glândula mamária .....	1
2. Tumores mamários caninos .....	3
2.1. Epidemiologia .....	3
2.1.1. Incidência.....	4
2.1.2. Sexo .....	4
2.1.3. Idade .....	4
2.1.4. Raça .....	5
2.1.5. Localização .....	5
2.1.6. Tumores malignos <i>versus</i> benignos.....	6
2.2. Etiologia .....	6
2.2.1. Fatores hormonais .....	6
2.2.2. Fatores genéticos .....	7
2.2.3. Fatores alimentares .....	8
2.2.4. Outros fatores .....	8
2.3. Patogenia/ Metastização .....	8
2.4. Diagnóstico.....	11
2.4.1. Clínico .....	11
2.4.2. Citológico .....	13
2.4.3. Histopatológico.....	14
2.5. Terapêutica .....	17
2.5.1. Cirurgia.....	17
2.5.2. Terapia adjuvante .....	19
2.5.2.1. Quimioterapia.....	19
2.5.2.2. Radioterapia .....	20
2.5.2.3. Terapia hormonal .....	20
2.5.2.4. Imunoterapia.....	20
2.6. Prognóstico.....	21
2.6.1. Tamanho tumoral.....	21
2.6.2. Envolvimento dos linfonodos.....	22
2.6.3. Estadiamento do tumor.....	22
2.6.4. Expressão de receptores hormonais.....	22
2.6.5. Grau de malignidade e tipo histológico .....	23
3. Classificação molecular dos tumores mamários .....	23
3.1. Classificação molecular na Mulher .....	23
3.2. Classificação molecular na cadela.....	27
4. Recetor do Fator de Crescimento Epidérmico Tipo II (HER-2).....	28
4.1. Papel fisiológico.....	29
4.2. Localização genómica e conformação molecular .....	30
4.3. Mecanismo de ação .....	31
4.4. Importância do diagnóstico do TM HER-2+ .....	33

4.4.1. Valor prognóstico.....	33
4.4.2. Terapêutica/Valor preditivo da resposta à terapêutica .....	34
4.5. Diagnóstico do TM HER-2+ .....	35
4.5.1. Diagnóstico ao nível do ADN .....	35
4.5.2. Diagnóstico ao nível do ARN .....	36
4.5.3. Diagnóstico ao nível da proteína.....	37
5. Sobre-expressão do HER-2 no TMC.....	38
6. Fator sérico do HER-2 (sHER-2) .....	40
6.1. Produção do sHER-2 .....	42
6.2. Utilidade do sHER-2.....	45
6.2.1. Indicador de prognóstico.....	45
6.2.2. Valor preditivo da resposta à terapêutica .....	46
6.2.3. Papel do sHER-2 na monitorização da terapêutica .....	47
6.2.4. Valor do sHER-2 no diagnóstico precoce de recidiva .....	47
6.3. Medição dos níveis de sHER-2.....	48
II. Objetivos do trabalho experimental .....	51
III. Material e Métodos .....	52
1. Amostragem .....	52
1.1. Seleção, recolha e processamento.....	52
1.2. Imuno-histoquímica.....	52
1.3. Material utilizado.....	53
1.3.1. Protocolo de <i>Dot Blot</i> .....	55
1.4. Cálculo da concentração de sHER-2 .....	55
1.5. Análise de resultados .....	56
IV. Resultados.....	56
1. Caracterização da amostra populacional .....	56
1.1. Variáveis clínico-patológicas – idade e raça .....	56
1.2. Caracterização da amostra de TMC's malignos .....	57
1.3. Quantificação do sHER-2 .....	59
1.3.1. Níveis de sHER-2 em cadelas com TM e em cadelas saudáveis .....	61
1.3.2. Exclusão dos soros hemolisados .....	62
1.4. Caracterização da população de cadelas saudáveis e de cadelas doentes quanto ao <i>status</i> HER-2 no soro.....	63
2. Concordância entre a técnica de Imuno-histoquímica e o <i>Dot Blot</i> .....	64
3. Correlação estatística dos níveis de sHER-2 e as variáveis clínico-patológicas .....	64
4. Associação entre os níveis de sHER-2 com a OS e DFS .....	66
V. Discussão.....	69
VI. Conclusões .....	74
Bibliografia .....	75
Anexos .....	94
Anexo 1 – Descrição das atividades desenvolvidas no estágio curricular .....	94
Anexo 2 – Resultados da Imuno-histoquímica.....	95
Anexo 3 – Informações adicionais .....	97

## Índice de figuras

Figura 1 – Esquema da drenagem linfática das glândulas mamárias na espécie canina ..	3
Figura 2 – Esquema da drenagem linfática das glândulas mamárias neoplásicas na cadela .....	10
Figura 3 – Estrutura molecular do HER-2.....	30
Figura 4 – Representação esquemática do processo de dimerização do recetor HER-2 com os restantes recetores HER da mesma família .....	32
Figura 5 – Imagens de carcinomas mamários felinos, após IHQ para HER-2.....	37
Figura 6 – Representação esquemática do HER-2 .....	44
Figura 7 – Imagem representativa do método de <i>Dot Blot</i> .....	50
Figura 8 – <i>Dot Blot</i> das amostras de sHER-2-felino de concentração conhecida .....	59
Figura 9 – Ensaio final de <i>Dot Blot</i> da membrana M1 .....	59
Figura 10 – Ensaio final de <i>Dot Blot</i> da membrana M2.....	60
Figura 11 – Soro não hemolisado .....	63
Figura 12 – Soro hemolisado.....	63

## Índice de tabelas

Tabela 1 – Sistema modificado de estadiamento de TMC's .....	12
Tabela 2 – Nova classificação histológica de TMC's: 2010 .....	15
Tabela 3 – Sistema de atribuição do grau histológico de malignidade para os carcinomas mamários caninos .....	16
Tabela 4 – Grau de malignidade dos TMC's.....	17
Tabela 5 – Caracterização dos TMC's .....	58
Tabela 6 – Concentrações de HER-2 sérico .....	62
Tabela 7 – Avaliação da expressão do HER-2 nos TMC's – resultados da IHQ e <i>Dot Blot</i> .....	64
Tabela 8 – Associação estatística entre os níveis de sHER-2 e as variáveis clínico-patológicas em estudo.....	65
Tabela 9 – Relação entre os níveis de sHER-2 e a OS .....	67
Tabela 10 – Relação entre os níveis de sHER-2 e o DFS.....	68
Tabela 11 – Resultados da IHQ de todos os tumores analisados e sua correspondência com os valores obtidos no <i>Dot Blot</i> .....	95

## Índice de gráficos

Gráfico 1 – Distribuição etária das cadelas com TM maligno .....	57
Gráfico 2 – Distribuição rácica das cadelas com TM maligno.....	57
Gráfico 3 – Representação da curva de calibração com R2= 0,9917 .....	60
Gráfico 4 – Representação da curva de calibração com R2= 0,883 .....	61
Gráfico 5 – Diagrama de extremos e quartis, representativo da associação entre o tamanho tumoral (classes T1, T2 e T3) e a concentração de sHER-2.....	66
Gráfico 6 – Sobrevivência total (OS) das cadelas com TM maligno .....	67
Gráfico 7 – Intervalo livre de doença (DFS) das cadelas com TM maligno .....	69
Gráfico 8 – Níveis de sHER-2 das cadelas saudáveis incluídas no estudo .....	97
Gráfico 9 – Níveis de sHER-2 das cadelas doentes incluídas no estudo.....	97

Gráfico 10 – Níveis de sHER-2 dos pacientes com tumores incluídos na categoria T1.	98
Gráfico 11 – Níveis de sHER-2 dos pacientes com tumores incluídos na categoria T2.	98
Gráfico 12 – Níveis de sHER-2 dos pacientes com tumores incluídos na categoria T3.	99
Gráfico 13 – Tamanhos de todos os tumores extirpados .....	99

## Lista de abreviaturas

Aa – Aminoácido
Ac – Anticorpo
Ad6 – Adenovírus do serotipo 6
ADAM – A disintegrin and metalloproteases (disintegrinas e metaloproteínas)
ADN – Ácido desoxirribonucleico
Ag – Antígeno
ARN – Ácido ribonucleico
ASCO – American Society of Clinical Oncology (Sociedade Americana de Oncologia Clínica)
BRCA1 – Breast cancer type 1 susceptibility protein
BRCA2 – Breast cancer type 2 susceptibility protein
Bcl-2 – B-cell lymphoma 2 (linfoma de células B 2)
BSA – Bovine serum albumin (albumina sérica bovina)
cADN – Ácido desoxirribonucleico complementar
CBR – Clinical benefit rate (taxa de benefício clínico – resposta e doença estável)
CEP17 – Centromeric probe 17 (sonda centromérica do cromossoma 17)
CISH – Chromogenic <i>in situ</i> hybridization (hibridização cromogénica <i>in situ</i> )
CK – Cytokeratin (citoqueratina)
CLIA – Chemiluminescent immunoassay (imunoensaio quimiluminescente)
COX-2 – Ciclo-oxigenase-2
DEC – Domínio extracelular
DFS – Disease-free survival (sobrevivência sem doença)
DIC – Domínio intracelular
DNA-EP – Eletroporação/eletropermeabilidade-ADN
DTM – Domínio transmembranário
ECL – Enhanced chemiluminescence (amplificador quimiluminescente)
EGF – Epidermal growth factor (fator de crescimento epidérmico)
EGFR – Epidermal growth factor receptor (receptor de fator de crescimento epidérmico)
EIA – Enzyme immunoassay (imunoensaio enzimático)
ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay (ensaio imunoabsorvente ligado a enzima)
FDA – Food and Drug Administration
FISH – Fluorescent <i>in situ</i> hybridization (hibridização fluorescente <i>in situ</i> )
FMV-ULisboa – Faculdade de Medicina Veterinária-Universidade de Lisboa
HB-EGF – Heparin-binding (fator de crescimento epidérmico ligado à heparina)
HER – Human epidermal growth factor receptor (receptor do fator de crescimento epidérmico humano)
HER-2 – Human epidermal growth factor receptor-2 (receptor do factor de crescimento epidérmico humano tipo-2)
HER-2+ – HER-2-positivo
HER-2- – HER-2-negativo
HRP – Horseradish peroxidase (peroxidase de rábano)
IHQ – Imuno-histoquímica
ISH – <i>In situ</i> hybridization (hibridização <i>in situ</i> )
mARN – Ácido ribonucleico mensageiro

MMP – Matrix metalloproteases (metaloproteinases da matriz)  
MPLA – Multiplex ligation-dependent probe amplification (amplificação “multiplex” de sondas dependentes da ligação)  
N – Número de casos  
OMS – Organização Mundial de Saúde  
ORR – Objective response rate (taxa de resposta objetiva)  
OS – Overall survival (sobrevivência total)  
OVH – Ovario-histerectomia  
PAAF – Punção aspirativa de agulha fina  
PARP-1 – poli-ADP ribosepolimerase-1  
PCR – Polymerase in chain reaction (reação em cadeia da polimerase)  
qRT-PCR – PCR quantitativo em tempo real  
RE – Recetores de estrogénio  
RP – Recetores de progesterona  
sHER-2 – Forma sérica do recetor HER-2  
SISH - Silver *in situ* hybridization (hibridização por prata *in situ*)  
SNC – Sistema nervoso central  
SNP – Sistema nervoso periférico  
SNS – Sistema nervoso simpático  
TAC – Tomografia axial computadorizada  
TBS – Tris buffered saline (tampão tris salino)  
TGF- $\alpha$  – Transforming growth factor-alfa (fator de crescimento transformante alfa)  
TIMP – Tissue inhibitors of metalloproteases (inibidores tecidulares de metaloproteinases)  
TM(´s) – Tumor(es) mamário(s)  
TMC(´s) – Tumor(es) mamário(s) canino(s)  
TMF(´s) – Tumor(es) mamário(s) felino(s)  
TMM (´s) – Tumor(es) mamário(s) metastático(s)  
TMP (´s) – Tumor(es) mamário(s) primário(s)  
TNM – Tumor-nodo-metástase (sistema de classificação TNM)  
TOPII $\alpha$  – Topoisomerase II-alfa  
TQ – Tirosina quinase  
TTP – Time to progression (tempo até à progressão da doença)

% – Percentagem

> – Maior

< – Menor

$\geq$  – Maior ou igual

$\leq$  – Menor ou igual

® – Marca registada

°C – Graus centígrados

cm – Centímetro

kDa – Kilodalton

ml – Mililitro

mm – Milímetro

$\mu$ l – Microlitro

ng – Nanograma



# **I. Revisão Bibliográfica**

## **1. Revisão anatômica e histológica da glândula mamária**

A característica constante da classe *Mammalia*, e graças à qual este grupo de animais recebeu o nome, é a presença de glândulas mamárias em todas as fêmeas (McGeady, Quinn, FitzPatrick & Ryan, 2006). Estas estruturas têm por função secretar leite para nutrir as crias e transmitir imunidade passiva, de forma a lhes conferir algum grau de proteção imunitária nos primeiros dias de vida (Junqueira & Carneiro, 2005).

Nas espécies domésticas, as glândulas mamárias formam-se a partir de dois espessamentos epiteliais da ectoderme na parede ventral do embrião - as linhas mamárias - que se estendem da região axilar à região inguinal (McGeady et al., 2006). A continuidade destes espessamentos é interrompida para dar lugar à formação de botões mamários, resultantes da proliferação de células epiteliais originárias do cordão mamário primário. Estas células agregam-se em áreas específicas, em número e em local apropriado, em função da espécie, para formar mais tarde glândulas mamárias funcionais (Cunningham, 2002; Jubb, Kennedy & Palmer, 1991). As células epiteliais dispõem-se de forma a dar origem a estruturas circulares ocas, designadas alvéolos, que constituem as unidades secretoras de leite da glândula mamária. Ao mesmo tempo, forma-se o mamilo à superfície, estrutura que permite a comunicação entre o exterior e o sistema secretor interno (Cunningham, 2002).

Cada glândula mamária é o conjunto de glândulas exócrinas do tipo túbulo-alveolar composto (Bragulla, Budras, Mulling, Reese & König, 2004; Junqueira & Carneiro, 2005) e a evidência embriológica existente sugere a sua derivação a partir da especialização de glândulas sudoríparas (Aughey & Frye, 2001; Jubb et al., 1991; McGeady et al., 2006).

A glândula mamária está dividida em unidades glandulares distribuídas bilateralmente, simétricas e paralelas à linha mediana ventral, estendendo-se do tórax até à região inguinal. Na cadela, estas unidades glandulares distribuem-se por cinco pares, constituindo os grupos torácicos cranial (1) e caudal (2), abdominais cranial (3), caudal (4) e inguinal (5) (Bragulla et al., 2004). Excepcionalmente podem ter apenas quatro pares (Peleteiro, 1994).

O conhecimento da anatomia microscópica da glândula mamária é importante para a compreensão das neoplasias com sede neste órgão (Monteiro-Riviere, 1998). Cada glândula está incluída numa cápsula fibroelástica que se estende até ao seu interior e a divide em lobos e lóbulos. Os lobos resultam da convergência dos lóbulos, que consistem num sistema de ductos separados entre si por septos de tecido conjuntivo denso e tecido adiposo interlobular (Aughey & Frye, 2001). Os ductos intralobulares drenam para canais excretores de maior calibre, os ductos lactíferos (Junqueira & Carneiro, 2005; Peleteiro, 1994) ou ductos

galactóforos (Cunningham, 2002) que se dilatam para formar o seio lactífero (Junqueira & Carneiro, 2005; Peleteiro, 1994) ou seio galactóforo (Cunningham, 2002) próximo da abertura do mamilo (Junqueira & Carneiro, 2005; Peleteiro, 1994).

Cada glândula mamária possui um número variado de aberturas, igual ao número de ductos papilares que variam, na cadela, entre 12 a 16 óstios externos (Bragulla et al., 2004). No entanto, outros autores referem 8 a 14 óstios (McGeady et al., 2006), 7 a 16 (Aughey & Frye, 2001) ou 8 a 20 óstios (Banks, 1986).

As unidades funcionais responsáveis pela secreção láctea são os alvéolos. Estas estruturas resultam da expansão das porções terminais dos ductos intralobulares e formam o parênquima glandular. Por outro lado, o estroma glandular, no qual se localizam os vasos e fibras nervosas, serve de tecido de sustentação (Aughey & Frye, 2001; Bragulla et al., 2004).

O epitélio de revestimento dos ductos lactíferos é formado por uma dupla camada de células epiteliais cúbicas ou cilíndricas baixas, enquanto os ductos intralobulares são revestidos por um epitélio simples cúbico ou cilíndrico, sobre uma membrana basal (Peleteiro, 1994). Assim, as células mioepiteliais, formando uma camada descontínua, assentam sobre a membrana basal e entre as células secretoras, contribuindo para a expulsão do leite ao contraírem sob a influência da ocitocina (Aughey & Frye, 2001; Peleteiro, 1994). O leite é produzido por secreção apócrina e merócrina (Monteiro-Riviere, 1998) - os lípidos são secretados de forma apócrina, enquanto as proteínas e os carbo-hidratos são secretados de forma merócrina (Banks, 1986).

Do ponto de vista oncológico, é imperativa a referência à rede linfática, pois esta assume extrema importância no que toca à metastização das neoplasias da glândula mamária, cuja drenagem linfática ocorre para os linfonodos regionais (Figura 1).

Com efeito, as glândulas mamárias torácicas e abdominais craniais drenam para o linfonodo axilar acessório, enquanto os linfonodos inguinais superficiais recebem a linfa proveniente das glândulas mamárias abdominais caudais e inguinais; por seu turno, as glândulas abdominais craniais drenam, simultaneamente, para os linfonodos axilares acessórios e para os linfonodos inguinais superficiais (Bragulla et al., 2004; Peleteiro, 1994). Muito ocasionalmente, as glândulas torácicas craniais drenam acessoriamente para os linfonodos esternais (Peleteiro, 1994).

É igualmente importante referir que existe comunicação entre algumas glândulas homolaterais, através da rede linfática, muito embora não ocorra entre as cadeias mamárias direita e esquerda (Peleteiro, 1994).

O desenvolvimento pós-fetal da glândula mamária inicia-se geralmente com a puberdade. No decorrer desta fase, a atividade ovárica cíclica resulta na produção de estrogénios e progesterona, que provocam alterações estruturais na glândula mamária (Cunningham, 2007).

Enquanto na fêmea impúbere a glândula mamária se apresenta como um sistema tubular rudimentar, na puberdade os estímulos hormonais vão alterar esta conformação. Na Mulher, a ação dos estrogénios estimula o desenvolvimento tubular e a acumulação de adipócitos no tecido interlobular, ao passo que na cadela esta estimulação provoca o desenvolvimento tubular, mas não há um aumento tão acentuado no número de células adiposas (Peleteiro, 1994).

Durante a gravidez, a ação da progesterona resulta na proliferação das estruturas alveolares nas porções

terminais dos ductos intralobulares, os quais irão ser mais tarde as unidades secretoras do leite (Bragulla et al., 2004; Junqueira & Carneiro, 2005). Na mama da fêmea lactante, a quantidade de tecido conjuntivo e adiposo é consideravelmente inferior em relação ao parênquima, ocorrendo o contrário nas fêmeas não

lactantes (Banks, 1986; Junqueira & Carneiro, 2005). As hormonas diretamente envolvidas na lactogénese são a prolactina, os glucocorticóides da suprarrenal e a somatomamotropina placentária; e, indiretamente, os estrogénios, a progesterona e a somatotropina (Peleteiro, 1994).

As constantes modificações do tecido glandular em resposta à atividade ovárica, e cujo resultado se manifesta pelo crescimento e involução das glândulas mamárias, têm sido associadas ao surgimento frequente de tumores mamários (TM's) na cadela (Bragulla et al., 2004; Cunningham, 2007).

## 2. Tumores mamários caninos

### 2.1. Epidemiologia

Os TM's são a segunda neoplasia mais frequente na espécie canina, a seguir aos tumores de pele (Dorn, Taylor, Frye & Hibbard, 1968; Morris & Dobson, 2001; Peleteiro, 1994).

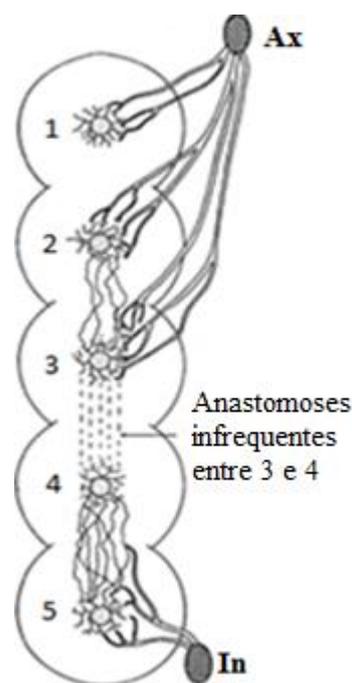


Figura 1 – Esquema da drenagem linfática das glândulas mamárias na espécie canina (adaptado de Silver, 1966). Ax – Linfonodo axilar; In – Linfonodos inguinais superficiais; 1 – Glândula torácica cranial; 2 – Glândula torácica caudal; 3 – Glândula abdominal cranial; 4 – Glândula abdominal caudal; 5 – Glândula inguinal.

Se considerarmos apenas as fêmeas desta espécie, nomeadamente as inteiras, os tumores de mama são a neoplasia mais comum (Misdorp, 2002; Peleteiro, 1994) - e duas a três vezes mais frequentes na cadela do que na Mulher (Misdorp, 2002; Schneider, 1970).

### **2.1.1. Incidência**

Vários estudos realizados em países europeus demonstraram uma taxa de incidência anual de aproximadamente 200/100 000 cães/ano (Sleeckx, Rooster, Kroeze, Van Ginneken & Van Brantegem, 2011). No Reino Unido, Dobson e colegas (2002) identificaram uma taxa de incidência anual de 205/100 000 cães/ano, concordante com a taxa de incidência anual de 198/100 000 cães/ano referida por Misdorp (2002).

É importante referir que a incidência de tumores mamários caninos (TMC's) está a decrescer nos países onde é prática comum a realização de ovário-histerectomia (OVH) em cadelas em idade precoce (8 semanas a 1 ano de idade) (Sleeckx et al., 2011), o que realça a importância desta intervenção.

### **2.1.2. Sexo**

Os TM's são praticamente exclusivos das fêmeas desta espécie (Peleteiro, 1994). As cadelas apresentam 62 vezes mais probabilidade de desenvolver este tipo de tumores do que os cães machos, nos quais os tumores de mama são predominantemente benignos (Euler, 2011), podendo estar associados a alterações hormonais, como é o caso do sertolinoma (Misdorp, 2002). No sexo masculino, a taxa de ocorrência varia entre 0 a 2,7%, sendo geralmente inferior a 1% (Bears, Schulman & Carter, 2012).

### **2.1.3. Idade**

Este é um dos fatores de risco mais importantes no desenvolvimento de TM's em cadelas (Sorenmo, Rasotto, Zappulli & Goldschmidt, 2011). Tal como na Mulher, as neoplasias mamárias na cadela são dependentes da idade, ocorrendo raramente antes dos 5 anos e com uma idade média de ocorrência entre os 10 e os 11 anos de idade (MacEwen & Withrow, 1996; Schneider, 1970).

Um estudo numa colónia de cães de raça Beagle, no Utah, identificou que o risco para o desenvolvimento de TM's começa a ser significativo por volta dos 8 anos, com aumento progressivo a partir desta idade (Taylor et al., 1976). À semelhança, num estudo realizado na Suécia, a idade de maior incidência de TM's em cadelas foi de 8 anos (Jitpean et al., 2012).

A maioria dos autores reporta o período entre os 8 e os 11 anos de idade como o de maior suscetibilidade para o aparecimento de TMC's, o que indica que esta é uma doença característica de cadelas de meia-idade ou mais velhas (Dobson, 2013; Sorenmo et al., 2011).

#### **2.1.4. Raça**

Em estudos europeus, nomeadamente na Suécia e Noruega, as raças English Springer Spaniel, Doberman Pinscher, Boxer, Cocker Spaniel e Daschund, foram reportadas como tendo predisposição para o desenvolvimento de neoplasia mamária (Egenvall et al., 2005; Moe, 2001).

Em Portugal, não é possível estabelecer uma relação entre os TMC's e qualquer raça em particular, pois é elevado o número de fêmeas de raça indeterminada (Peleteiro, 1994).

Em suma, alguns autores sugerem que as raças mais afetadas são as: Poodle, Chihuahua, Daschund, Yorkshire Terrier, Cocker Spaniel, English Springer Spaniel, Setter Inglês, Pastor Alemão, Pointer, Doberman e Boxer (Euler, 2011; Sorenmo, Worley & Goldschmidt, 2013). A maior incidência, em alguns estudos, de TM's em cadelas de raças pequenas, pode dever-se ao maior número de exemplares destas raças (Sorenmo et al., 2011).

Por outro lado, a variação na incidência de TM's entre as diferentes raças sugere uma componente hereditária significativa (Dobson, 2013; Sorenmo et al., 2011). No entanto, ainda não foi identificada uma mutação genética comum em cadelas com TM (Sleekx et al., 2011).

#### **2.1.5. Localização**

Na cadela, os dois pares caudais de glândulas mamárias são os mais frequentemente afetados por tumores de mama (MacEwen & Withrow, 1996; Misdorp 2002; Morris & Dobson, 2001), provavelmente devido ao facto destas glândulas apresentarem maior quantidade de parênquima mamário (MacEwen & Withrow, 1996). A maioria dos animais apresenta tumores múltiplos (Misdorp 2002; Sorenmo et al., 2011), que podem mostrar várias neoplasias primárias e/ou espalhamento por invasão direta ou metástases (Misdorp, 2002). Nestas situações podem estar presentes diferentes tipos tumorais (Sleekx et al., 2011). Também, a presença de tumores em mais de uma glândula mamária, assim como o facto de se poder observar mais de um tumor na mesma glândula, permite considerar os TM's na cadela como neoplasias multicêntricas (Peleteiro, 1994). Nestes casos, é frequente o envolvimento de várias glândulas e toda a cadeia homolateral pode estar afetada (Peleteiro, 1994); pode, inclusive, existir envolvimento bilateral (MacEwen & Withrow, 1996). Por seu turno, as glândulas mamárias axilares normalmente não estão afetadas numa primeira ocorrência (Sorenmo et al., 2011).

### **2.1.6. Tumores malignos *versus* benignos**

A percentagem de TM's malignos é de aproximadamente 50% (Euler, 2011; MacEwen & Withrow, 1996; Morris & Dobson, 2001), sendo que a ocorrência de tumores benignos em cadelas mais jovens é mais provável do que em cadelas com idade mais avançada (Sorenmo et al., 2011). É importante referir o facto da percentagem de tumores benignos poder ser artificialmente baixa, devido ao número de casos em que tumores diagnosticados clinicamente não são extirpados ou em que não é realizado o exame histopatológico das massas extirpadas (Misdorp, 2002; Morris & Dobson, 2001; Peleteiro, 1994). Assim sendo, o rácio de 70/30 de TM's benignos/malignos referido por Misdorp (2002) poderá representar uma estimativa mais correta. Num estudo efetuado no laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa (FMV-UL) foram diagnosticados TMC's malignos em 87,3% dos casos e a percentagem de lesões benignas foi de 12,7% (Costa, 2010).

No que se refere ao tipo tumoral, aproximadamente 90% dos TM's malignos são carcinomas (Morris & Dobson, 2001) e <5% são sarcomas (MacEwen & Withrow, 1996).

## **2.2. Etiologia**

### **2.2.1. Fatores hormonais**

A produção de hormonas sexuais femininas, estrogénio e progesterona, está associada ao desenvolvimento de neoplasias mamárias em cadelas (Euler, 2011; Misdorp, 2002; Morris & Dobson, 2001). A exposição endógena em idade precoce às hormonas ováricas representa a causa mais importante para o desenvolvimento destes tumores (Sorenmo et al., 2011). Este facto é apoiado por um estudo de Schneider, Dorn e Taylor (1969) que revelou que o risco relativo para o desenvolvimento de TM se relaciona diretamente com a frequência dos ciclos éstricos na cadela. Neste estudo, cadelas ovariectomizadas antes do primeiro cio apresentaram um risco de apenas 0,5% para o desenvolvimento de neoplasia mamária, comparado com um risco de 8% e 26% para cadelas castradas entre o primeiro e segundo cio ou após o segundo cio, respetivamente. Adicionalmente, não foi encontrado um efeito protetor significativo decorrente da castração de cadelas após o segundo cio. De forma semelhante, Taylor et al. (1976) concluíram que a realização de OVH após os quatro anos de idade não demonstrou ter qualquer efeito protetor no desenvolvimento de TM's. Por outro lado, Misdorp (1988) refere algum efeito protetor benéfico decorrente da castração de cadelas com idade mais avançada, no que respeita ao desenvolvimento de TM's benignos.

Deste modo, pode-se concluir que o efeito protetor da castração está diretamente relacionado com o grau de exposição das cadelas às hormonas ováricas sendo que, quanto menor for esta

exposição, maior é o efeito benéfico deste método cirúrgico (Misdorp 2002; Sorenmo et al., 2011). Esta constatação sugere que os eventos que mais predisõem a glândula mamária ao desenvolvimento tumoral ocorrem precocemente (Sorenmo et al., 2011).

Relativamente à administração exógena de alguns progestagénios, esta pode aumentar o risco de ocorrência de tumores benignos (Misdorp, 2002; Morris & Dobson, 2001) e de hiperplasia nodular, em cadelas (Chun & Garret, 2005; Jones, Hunt & King, 1997; MacEwen & Withrow, 1996). Estas hormonas não estão, contudo, associadas ao aumento da incidência de neoplasias malignas da glândula mamária (Misdorp, 1988; Morris & Dobson, 2001). Por outro lado, a administração prolongada de estrogénios não aumenta a incidência de neoplasias mamárias em cadelas (Chun & Garret, 2005; MacEwen & Withrow, 1996; Misdorp, 2002).

No que respeita à expressão de recetores hormonais, os TM's benignos e malignos expressam recetores de progesterona (RP) e de estrogénio (RE) entre 40% a 70% dos casos (Morris & Dobson, 2001). Quanto à expressão diferencial destes recetores, os tumores malignos, particularmente os de maior tamanho, com menor diferenciação, e em fases mais avançadas da doença, expressam estes recetores hormonais em menor quantidade do que os tumores benignos e tumores com fatores de prognóstico mais favoráveis (Martín de las Mulas, Millan & Dios, 2005). Por fim, apesar de existirem dados contraditórios, não foi comprovada uma relação entre o aumento do risco de aparecimento de TMC's e a ocorrência de ciclos éstricos irregulares ou de pseudogestação, segundo Misdorp (2002).

### **2.2.2. Fatores genéticos**

Poucos dados foram publicados, até à data, no que se refere ao estudo da expressão génica de TM's em cães (Misdorp, 2002).

Um estudo recente realizado no Laboratório de Anatomia Patológica da FMV-UL demonstrou uma associação estatisticamente significativa entre o aumento da expressão da ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e o maior tamanho tumoral e menor grau de diferenciação de TM's em cadelas (Marques, 2013). Num estudo sueco, em cadelas da raça English Springer Spaniel, com o objetivo de analisar a relação entre os TMC's e a presença de 10 oncogenes humanos para o cancro mamário, foi demonstrada uma associação entre o desenvolvimento destes tumores e mutações nos genes BRCA1 (*breast cancer type 1 susceptibility protein*) e BRCA2 (*breast cancer type 2 susceptibility protein*) (Rivera et al., 2009). Também, mutações no gene p53, semelhantes às que ocorrem na Mulher, foram associadas com a ocorrência de TMC's (Chu et al., 1998).

Assim, algumas das alterações associadas ao desenvolvimento de TMC's incluem: mutações no gene supressor p53, níveis elevados de expressão da COX-2 com tumores de fenótipo

maligno e com pior prognóstico, mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 e sobre-expressão do oncogene HER-2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 – recetor do fator de crescimento epidérmico humano tipo-2) (Dobson, 2013; Misdorp, 2002). A importância do oncogene HER-2 na génese de TM's será aprofundada com maior detalhe ao longo desta dissertação.

### **2.2.3. Fatores alimentares**

Segundo Euler (2011), a obesidade numa idade jovem e o consumo de refeições caseiras têm sido associadas a um risco acrescido de desenvolvimento de neoplasias mamárias. Um estudo efetuado para investigar a associação entre a dieta e a conformação corporal e o risco de desenvolvimento de TMC's, demonstrou que este risco é significativamente menor em cadelas castradas que apresentaram baixa condição corporal entre os 9 e os 12 meses de idade. Em todo o caso, não se encontrou uma associação entre os TMC's e o consumo de uma dieta rica em gorduras (Sonnenschein, Glickman, Goldschmidt & McKee, 1991). Por outro lado, Pérez-Alenza e colegas (1998) demonstraram que cadelas alimentadas com refeições caseiras ou com uma dieta rica em carnes vermelhas apresentaram um risco maior para o desenvolvimento de neoplasias mamárias quando comparadas com cadelas alimentadas com dieta comercial.

Ante o exposto, verifica-se que os fatores nutricionais aparentam ter influência no desenvolvimento deste tipo de tumores, numa idade precoce. E uma possível explicação para que tal ocorra poderá dever-se às modificações ao nível da concentração e da disponibilidade das hormonas sexuais (Misdorp, 2002).

### **2.2.4. Outros fatores**

Tendo em conta o fator radiação, estudos em cães de raça Beagle demonstraram que a incidência de TM's é semelhante no grupo controlo e no grupo irradiado (Moulton, Rosenblatt & Goldman, 1986). Contudo, no caso dos animais sujeitos a radiação, as lesões neoplásicas malignas tendem a aparecer numa idade mais precoce (Andersen & Rosenblatt, 1969).

## **2.3. Patogenia/ Metastização**

A distinção mais importante entre tumores benignos e malignos reside no facto destes últimos terem capacidade para invadir localmente e metastizar sistemicamente. Os tumores malignos são, frequentemente, muito invasivos, ao passo que os tumores benignos apresentam limites

distintos em relação aos tecidos adjacentes (os tumores epiteliais benignos apresentam-se geralmente encapsulados) (Kusewitt & Rush, 2007).

A carcinogénese é um processo complexo, sendo necessárias pelo menos cinco a seis mutações sequenciais para que a célula demonstre as características que a tornam maligna. Estas características, designadas *Hallmarks of Cancer* (Hanahan & Weinberg, 2000) apresentam os seguintes parâmetros:

1. Autossuficiência em fatores de crescimento;
2. Insensibilidade aos fatores inibidores de crescimento;
3. Capacidade de evasão à apoptose;
4. Capacidade de replicação ilimitada;
5. Promoção da angiogénese;
6. Capacidade de invadir os tecidos e metastizar.

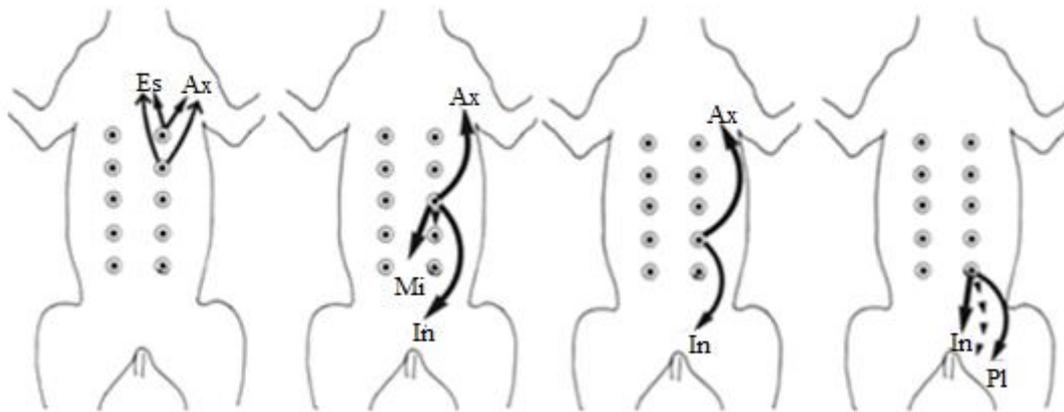
Tal como anteriormente referido, a maior parte das neoplasias mamárias malignas é classificada como carcinoma e cerca de 5% como sarcoma. Ordinariamente, a maioria dos tumores malignos epiteliais metastizam por via linfática, enquanto os sarcomas utilizam, preferencialmente, a via hematogénea (MacEwen & Withrow, 1996).

Desta forma, torna-se indispensável o conhecimento da drenagem linfática das glândulas mamárias, já descrita no início desta dissertação, mas sublinhando, agora, outros aspetos relevantes. Há que ter em conta, pois, que o padrão de drenagem normal pode estar alterado em cadelas com neoplasia mamária (Sorenmo et al., 2011).

Patsikas et al. (2006), num estudo em 41 cadelas inteiras com TM, demonstrou que as glândulas torácicas neoplásicas drenavam, raramente, para os linfonodos ipsilaterais axilares e esternais, simultaneamente. A glândula mamária abdominal cranial apresentava, em casos raros, drenagem simultânea para os linfonodos ipsilaterais axilares, inguinais superficiais e mediais ilíacos. Em relação à glândula abdominal caudal, observou-se que raramente drenava de forma simultânea para os linfonodos ipsilaterais inguinais superficiais e axilares. Neste estudo, foi também observada a drenagem linfática da glândula mamária inguinal para o linfonodo poplíteo ipsilateral e em direção a um plexo linfático no lado medial da coxa (Figura 2).

A análise destes resultados é muito importante na medida em que ajuda a determinar quais os linfonodos que deverão ser avaliados nos casos em que há suspeita clínica da presença de carcinoma mamário (Sorenmo et al., 2011), assim como presta auxílio ao cirurgião na determinação da melhor excisão cirúrgica e na formulação de um prognóstico pós-cirúrgico mais adequado (Patsikas et al., 2006).

Figura 2 – Esquema da drenagem linfática das glândulas mamárias neoplásicas na cadela (adaptado de Patsikas et al., 2006).



Legenda: Ax – Linfonodos axilares; Es – Linfonodos esternais; In – Linfonodos inguinais superficiais; Mi – Linfonodos mediais ilíacos; Pl – Linfonodo poplíteo.

Tendo em conta a metastização preferencial dos sarcomas por via sanguínea, salienta-se o facto de esta via ser a responsável pelo aparecimento de metástases nos diversos órgãos, sem que os linfonodos regionais tenham sido atingidos (Peleteiro, 1994). As veias são as estruturas mais frequentemente invadidas pelas células malignas, pois apresentam uma parede mais fina comparativamente às artérias, o que favorece a invasão tumoral (Kusewitt & Rush, 2007). Para além do facto da rede venosa apresentar mais anastomoses do que a rede arterial, pequenas veias atravessam a linha média mais frequentemente do que as artérias, o que facilita a deposição de células malignas nas glândulas mamárias adjacentes e contralaterais (Silver, 1966). Estas células cancerígenas podem alcançar, posteriormente, a veia cava e/ou a veia porta e alojarem-se nos pulmões e/ou fígado, respetivamente (Kusewitt & Rush, 2007).

Histologicamente, as características mais importantes nos carcinomas (e que deixam antever o seu comportamento e *outcome* clínico mais provável) é se estes tumores apresentam uma boa diferenciação e limites bem definidos ou se, por outro lado, são infiltrativos e invasivos. Os que apresentam invasão local tendem a metastizar rapidamente para os linfonodos regionais e pulmões e, em menor proporção, para os órgãos abdominais e ossos (Morris & Dobson, 2001). Há que referir, no entanto, que esta evidência histológica de malignidade não implica, invariavelmente, um comportamento clínico maligno. Adicionalmente, a aparência histológica pode variar consideravelmente numa mesma massa devido à multiplicidade lesional tão característica dos TM's em cadelas (MacEwen & Withrow, 1996; Peleteiro, 1994).

Misdorp (2002) refere que a principal causa de morte em cadelas após mastectomia é a ocorrência de metástases. Sendo que, numa fase inicial, a metastização em órgãos distantes tais como o fígado, os ossos, e a pleura, sem o envolvimento dos pulmões, ocorre raramente. De forma semelhante, o *bypass* dos linfonodos regionais também é raro, indicando que estes e

os pulmões funcionam, pelo menos numa fase inicial, como filtros no processo de metastização.

## **2.4. Diagnóstico**

### **2.4.1. Clínico**

O diagnóstico clínico deve ter como suporte uma história progressiva completa, nomeadamente no que respeita a dados relativos à data de início da lesão, velocidade de crescimento, manifestações de prurido, eliminação de secreções e estado reprodutivo do animal (Peleteiro, 1994). Durante o exame físico, deve ser realizada a palpação minuciosa de todas as glândulas mamárias e registada a consistência, localização, dimensão, número, eventuais sinais de aderência à pele e tecidos envolventes, deformações dos mamilos e presença de ulceração (MacEwen & Withrow, 1996; Peleteiro, 1994). Em lesões de maior malignidade pode estar presente eritema da pele, hipertermia e, por vezes, ulceração e edema. Estas são características dos TM's mais agressivos, como o carcinoma inflamatório, no qual a sobrevivência é de apenas algumas semanas após o diagnóstico (Euler, 2011). Os TM's, geralmente, são facilmente palpáveis como nódulos discretos ou massas nas glândulas mamárias, sendo que a técnica de palpação apenas permite a deteção de nódulos com tamanho superior a 0,5 cm de diâmetro (Morris & Dobson, 2001; Peleteiro, 1994). Os linfonodos regionais devem ser igualmente palpados, muito embora normalmente não sejam detetáveis, a não ser que se encontrem hipertrofiados. Na verdade, os TM's podem apresentar-se como massas pedunculadas ou sésseis, sólidas ou quísticas, ulceradas ou cobertas por pele ou pêlos (Fossum et al., 2007).

Apesar de alguns sinais clínicos poderem apontar no sentido da malignidade (o rápido crescimento, o tamanho tumoral, a ulceração e a fixação à pele e tecidos adjacentes), é geralmente impossível a diferenciação clínica entre neoplasias benignas e malignas da glândula mamária no cão (Misdorp, 2002).

Finalmente, devem ser realizadas radiografias à cavidade torácica nos planos laterais direito, esquerdo e ventrodorsal, para avaliação da presença de metástases nos pulmões e linfonodos esternais (MacEwen & Withrow, 1996). A metastização para os pulmões ocorreu em 25% a 50% dos casos de TM's malignos, aquando do diagnóstico clínico (Fossum et al., 2007); mas a dispneia é raramente detetada em cães com metastização pulmonar (Morris & Dobson, 2001). Deste modo, o estudo radiográfico do tórax é indispensável e deve ser realizado de forma sistemática, mesmo na ausência de suspeição clínica de metastização pulmonar, no sentido de se poder determinar de forma mais rigorosa se ocorreu generalização do processo (Peleteiro, 1994). Este exame não permite, no entanto, a exclusão inequívoca de ocorrência de

metastização, devido ao facto da pequena dimensão das metástases (menos de 0,5 cm) poder impossibilitar a sua deteção radiográfica (Peleteiro, 1994).

A tomografia axial computadorizada (TAC) proporciona um método mais sensível na deteção de metastização pulmonar (Otoni et al., 2010), permitindo a deteção de nódulos pulmonares com 1 mm de diâmetro (Nemanic, London & Wisner, 2006).

Com base na avaliação clínica, o estadiamento clínico do tumor deve ser sempre realizado. O sistema TNM (Tumor, Linfonodo e Metástase) originalmente proposto pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (Owen, 1980) e modificado por MacEwen e Withrow em 1996 (Tabela 1) permite o estadiamento da fase de evolução do processo neoplásico, sendo esta classificação aplicável apenas aos carcinomas, excluindo o carcinoma inflamatório. No caso de tumores múltiplos, o estadiamento deve ser feito tendo em conta o tumor maligno de maior dimensão (Sorenmo et al, 2011).

Tabela 1 – Sistema modificado de estadiamento de TMC's (segundo Lana, Rutteman & Withrow, 2007).

<b>T: Tumor primário</b>			
T1 < 3cm de diâmetro máximo			
T2 3-5 cm de diâmetro máximo			
T3 > 5 cm de diâmetro máximo			
<b>N: Estado linfonodos regionais</b>			
N0 Histologia ou citologia – Sem metástases			
N1 Histologia ou citologia – Presença de metástases			
<b>M: Metástases à distância</b>			
M0 – Sem metástases à distância detetadas			
M1 – Com metástases à distância detetadas			
<b>Estádios</b>			
<b>I</b>	T1	N0	M0
<b>II</b>	T2	N0	M0
<b>III</b>	T3	N0	M0
<b>IV</b>	Qualquer T	N1	M0
<b>V</b>	Qualquer T	Qualquer N	M1

## 2.4.2. Citológico

O diagnóstico citológico é pouco explorado na consulta de oncologia da mama na cadela, o que tem causado, em comparação com a Medicina Humana, uma percentagem de diagnósticos corretos mais baixa (Peleteiro, 1994). Em Medicina Veterinária, a obtenção de bons esfregaços para avaliação citológica é dificultada por diversos fatores, tais como: a presença de grande número de células necrosadas, inflamatórias e eritrócitos; um número ausente ou insuficiente de células; e quantidades consideráveis de líquido, no caso dos tumores quísticos (Peleteiro, 1994; Sontas, Ozturk, Toydemir, Arun & Ekici, 2012).

Por seu turno, Allen, Prasse e Mahaffey (1986) referem que a heterogeneidade dos TMC's, a dificuldade em se definirem os critérios de malignidade, a presença de necrose ou inflamação e os erros metodológicos são responsáveis pela diminuição significativa das percentagens relativas à sensibilidade e especificidade do exame citológico.

A citologia realizada por punção aspirativa de agulha fina (PAAF) é um método muito útil, uma vez que, para além de ser uma técnica não invasiva e que não necessita de anestesia, apresenta melhor celularidade e arquitetura celular do que o esfregaço obtido por aposição ou a partir da secreção por compressão do mamilo (Tvedten & Cowell, 2004). A este propósito importa referir que a avaliação citológica dos linfonodos regionais é altamente sensível na deteção da doença metastática em pacientes com tumores sólidos (Sorenmo et al., 2011). Assim, a presença de metástases nos linfonodos regionais deve ser analisada no exame citológico, a fim de auxiliar no estadiamento da doença. Na verdade, a presença de células epiteliais (mesmo as pouco alteradas) sinalizam a ocorrência de metastização e testemunham uma maior malignidade tumoral, enquanto alterações mais pronunciadas das células epiteliais provenientes do tumor são mais equívocas na avaliação de malignidade (Fossum et al., 2007; Tvedten & Cowell, 2004).

Apesar de todas as dificuldades referidas, alguns estudos têm mostrado uma boa correlação entre os resultados do exame citológico e o exame histopatológico.

Num estudo de Sontas et al. (2012), que incluiu 55 cadelas com TM's, a análise citológica para o diagnóstico de malignidade demonstrou uma sensibilidade de 96% e uma especificidade de 100%. Estes autores referem que a PAAF é um método de diagnóstico com validade na diferenciação entre a neoplasia mamária maligna e benigna na cadela, quando são excluídas da análise estatística as amostras inadequadas. Segundo Simon et al. (2009), a sensibilidade e especificidade da análise citológica para o diagnóstico de malignidade, usando a histopatologia como método de referência, foi de 88% e 96%, respetivamente.

### 2.4.3. Histopatológico

O diagnóstico histopatológico é fundamental na apreciação correta de uma lesão suspeita de ser uma neoplasia mamária. Em Medicina Veterinária, o tratamento recomendado para estas lesões é cirúrgico, pelo que o diagnóstico histopatológico é geralmente realizado sobre a totalidade do tumor, não havendo indicação para realização de biópsia (Peleteiro, 1994).

Em 1974, a OMS publicou a primeira *Classificação Histológica Internacional de Tumores dos Animais de Companhia* (Hampe & Misdorp, 1974). Esta classificação, baseada em morfologia descritiva (Misdorp, 2002), incluiu os tumores e as displasias da glândula mamária e tem vindo a sofrer diversas atualizações. Recentemente, Goldschmidt et al. (2011) propuseram uma nova classificação para os TMC's (Tabela 2), sob o pretexto de novos subtipos histológicos terem sido descritos.

Algumas das modificações propostas passam pela introdução do carcinoma cribriforme e do comedocarcinoma como entidades específicas (anteriormente estavam incluídos no grupo dos carcinomas *in situ*); pela classificação de novas variantes malignas relativas a tumores anteriormente descritos como benignos, nomeadamente, o carcinoma ductal como variante maligna do adenoma ductal (anteriormente classificado como adenoma basalóide) e o carcinoma papilar intraductal, como variante maligna do adenoma papilar intraductal (antes classificado como papiloma ductal); e pela inclusão de novos tipos histológicos, tais como o carcinoma inflamatório incluído no grupo das neoplasias epiteliais malignas de tipo especial, o carcinoma micropapilar e o mioepitelioma maligno, identificados por marcadores de imuno-histoquímica (IHQ) para células epiteliais (citoqueratinas 7, 8, 18, 19) e basais/mioepiteliais (citoqueratinas 5, 6, 14, 17; actina do músculo liso; calponina; vimentina e p63) (Goldschmidt et al., 2011).

Tabela 2 – Nova classificação histológica de TMC's: 2010 (segundo Goldschmidt et al., 2011).

<p><b>I: Neoplasias epiteliais malignas</b></p> <p>Carcinoma <i>in-situ</i>            Carcinoma simples           <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tubular</li> <li>• Túbulo-papilífero</li> <li>• Quístico-papilar</li> <li>• Cribriforme</li> </ul>           Carcinoma micropapilar invasivo            Carcinoma sólido            Comedocarcinoma            Carcinoma anaplásico            Carcinoma em adenoma complexo/Tumor misto            Carcinoma tipo complexo            Carcinoma tipo misto            Carcinoma ductal</p>	<p><b>IV: Carcinossarcoma – tumor mamário misto maligno</b></p>
<p><b>II: Neoplasias malignas epiteliais – tipos especiais</b></p> <p>Carcinoma escamoso            Carcinoma adenoescamoso            Carcinoma mucinoso            Carcinoma rico em lípidos            Carcinoma de células fusiformes           <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mioepitelioma maligno</li> <li>• Carcinoma escamoso – variante de células fusiformes</li> <li>• Carcinoma de células fusiformes</li> </ul>           Carcinoma inflamatório</p>	<p><b>V: Neoplasias benignas</b></p> <p>Adenoma simples            Adenoma papilar intraductal            Adenoma ductal           <ul style="list-style-type: none"> <li>• Com diferenciação escamosa</li> </ul>           Fibroadenoma            Mioepitelioma            Adenoma complexo            Tumor misto benigno</p>
<p><b>III: Neoplasias malignas mesenquimais – sarcomas</b></p> <p>Osteossarcoma            Condrossarcoma            Fibrossarcoma            Hemangiossarcoma            Outros sarcomas</p>	<p><b>VI: Hiperplasia/Displasia</b></p> <p>Ectasia ductal            Hiperplasia lobular (adenose)           <ul style="list-style-type: none"> <li>• Regular</li> <li>• Com atividade secretora</li> <li>• Com fibrose interlobular</li> <li>• Com atipia</li> </ul>           Epiteliose            Papilomatose            Alteração fibroadenomatosa            Ginecomastia</p> <p><b>VII: Neoplasias do mamilo</b></p> <p>Adenoma            Carcinoma            Carcinoma com infiltração epidérmica</p>
	<p><b>VIII: Hiperplasia/displasia do mamilo</b></p> <p>Melanose da pele do mamilo</p>

Têm sido utilizados para classificar os carcinomas mamários caninos, diferentes sistemas de classificação que atribuem um grau histológico de malignidade (Tabela 3). Estes sistemas de estadiamento histológico são, na sua maioria, baseados no método de *Elston & Ellis* (1991), desenvolvido para avaliar o cancro da mama na Mulher (Sorenmo et al., 2013). Estes sistemas permitem quantificar a anaplasia tumoral e incluem a avaliação de critérios como a formação tubular, o pleomorfismo nuclear e a atividade mitótica (Clemente, Perez-Alenza, Illera & Peña, 2010; Misdorp, 2002). A soma das pontuações individuais atribuídas para cada critério determina o grau de malignidade tumoral, o qual apresenta valor prognóstico. O grau 1 de malignidade (pontuação baixa) corresponde a um tumor bem diferenciado, o grau 2 (pontuação intermédia) corresponde a um tumor moderadamente diferenciado e o grau 3 de malignidade (pontuação máxima) corresponde a um tumor pouco diferenciado (Tabela 4) (Misdorp, 2002; Sorenmo et al., 2013).

Tabela 3 – Sistema de atribuição do grau histológico de malignidade para os carcinomas mamários caninos (adaptado de Goldschmidt et al., 2011).

Pontuação	Formação Tubular	Pleomorfismo Nuclear	Mitoses por 10 CGA/Hipercromatismo
<b>1 ponto</b>			
Clemente et al., 2010	Formações tubulares em > 75% do tumor	Núcleos pequenos uniformes ou regulares e, ocasionalmente, nucléolo	0-9 mitoses /10 CGA
Misdorp, 2002	Formações tubulares bem marcadas	Discreta heterogeneidade na forma e coloração nuclear	Aparecimento ocasional de núcleos hipercromáticos ou mitoses por CGA
<b>2 pontos</b>			
Clemente et al., 2010	Organização tubular moderada (10-75% do tumor), em conjunto com áreas de crescimento tumoral sólido	Grau moderado de variação do tamanho e forma nuclear, núcleo hipercromático, presença de nucléolo (alguns dos quais proeminentes)	10-19 mitoses/10 CGA
Misdorp, 2002	Formação moderada de túbulos	Moderada heterogeneidade na forma e coloração nuclear	2-3 núcleos hipercromáticos ou mitoses por CGA

Tabela 3 – continuação

<b>3 pontos</b>			
Clemente et al., 2010	Formação tubular mínima ou inexistente (<10%)	Variação marcada no tamanho nuclear e núcleo hipercromático, frequentemente com um ou mais nucléolos proeminentes	>20 mitoses /10 CGA
Misdorp, 2002	Poucos ou nenhuns túbulos	Marcada heterogeneidade na forma e coloração nuclear	2-3 núcleos hipercromáticos ou mitoses por CGA

Legenda: CGA – Campo em grande ampliação.

Tabela 4 – Grau de malignidade dos TMC's (adaptado de Goldschmidt et al., 2011).

<b>Pontuação total</b>	<b>Grau de malignidade</b>
<b>3 a 5</b>	
Clemente et al., 2010	<b>I (baixo)</b>
Misdorp, 2002	Bem diferenciado
<b>6 a 7</b>	
Clemente et al., 2010	<b>II (intermédio)</b>
Misdorp, 2002	Moderadamente diferenciado
<b>8 a 9</b>	
Clemente et al., 2010	<b>III (alto)</b>
Misdorp, 2002	Fracamente diferenciado

## 2.5. Terapêutica

### 2.5.1. Cirurgia

A cirurgia é o tratamento de eleição para todas as neoplasias mamárias, exceto para o carcinoma inflamatório (Henry, 2009). No caso de animais com recidivas e em idade avançada ou com metástases à distância, este não é o método terapêutico recomendado (Misdorp, 2002; Peleteiro, 1994). A excisão cirúrgica permite o diagnóstico histológico e pode ser curativa, pode melhorar a qualidade de vida ou alterar a progressão da doença (Fossum et al., 2007). A seleção da técnica cirúrgica para remoção do tumor e do tecido mamário depende de vários fatores como por exemplo: o tamanho, a localização, a consistência, o grau de infiltração tumoral, o número de tumores, o estado do paciente, a preferência do cirurgião e se há invasão dos linfonodos regionais ou não (Fossum et al., 2007; Misdorp, 2002). A combinação de diferentes técnicas cirúrgicas pode ser a opção mais

indicada no caso de tumores múltiplos na mesma cadeia ou em ambas as cadeias mamárias. No caso da ressecção completa ser impossível num primeiro procedimento, uma segunda intervenção pode ser realizada passadas 3 a 4 semanas, de forma a permitir a cicatrização e o alívio da tensão cutânea (Fossum et al., 2007).

O objetivo do tratamento cirúrgico em cadelas com neoplasia mamária é remover a totalidade do tumor, utilizando, para isso, o procedimento mais simples. Esta escolha é determinada pelo tamanho do tumor, a sua fixação aos tecidos adjacentes, o número de lesões e a probabilidade de ocorrência de cura no local (Lana et al., 2007).

Segundo estes autores, as técnicas descritas para remoção do TMC são as seguintes:

- a) **Lumpectomia (Nodulectomia):** indicada para tumores de tamanho inferior a 0,5 cm, firmes, superficiais, sem fixação e que são normalmente benignos. Este procedimento não está indicado no caso de tumores malignos.
- b) **Mastectomia:** corresponde à remoção da glândula mamária afetada por lesões nela localizadas centralmente, com diâmetro superior a 1 cm e algum grau de fixação à pele ou à fáscia, que também deverão ser removidos quando afetados.
- c) **Mastectomia Regional:** originalmente proposta tendo em conta a drenagem venosa e linfática das glândulas mamárias, consiste na extirpação *en bloc* das glândulas 1, 2 e 3, no caso da presença de tumores em alguma destas glândulas; e, de forma semelhante, na remoção *en bloc* das glândulas 4 e 5, se estiverem presentes tumores nesta localização.
- d) **Mastectomia Unilateral ou Bilateral:** corresponde à extirpação das glândulas mamárias 1 a 5 (de uma ou de ambas as cadeias mamárias). Está indicada no caso de tumores múltiplos ou tumores vários de grande dimensão, quando este procedimento resulta numa remoção mais rápida e abrangente com recurso a menos intervenções.

Devido à associação anatómica próxima entre as glândulas mamárias caudais e os linfonodos inguinais superficiais, assim como a possibilidade de estarem presentes células tumorais nos vasos linfáticos ou nos próprios linfonodos, está recomendada a sua remoção aquando a extirpação das glândulas mamárias caudais. No caso dos linfonodos axilares, estes só devem ser removidos quando há suspeita clínica ou a análise citológica é indicativa da presença de metástases (Lana et al., 2007; Misdorp, 2002).

A OVH pode ser realizada no momento da mastectomia e, neste caso, deverá ser realizada antes da remoção do tumor para prevenir a contaminação com células tumorais da cavidade abdominal (Fossum et al., 2007).

Sorenmo, Shofer e Goldschmidt (2000) observaram, considerando os dados disponíveis de um estudo que utilizou 137 cadelas com carcinomas mamários, que os animais submetidos a

OVH menos de 2 anos antes, ou na altura da mastectomia, apresentaram um incremento no tempo de sobrevivência de 45%, comparativamente às cadelas inteiras ou castradas num intervalo superior a 2 anos. Estes autores concluíram que a OVH apresenta efeito benéfico e que o seu *timing* é um fator com influência na sobrevivência. Contrariamente, noutra estudo retrospectivo que incluiu 99 cadelas com carcinomas mamários, a sobrevivência não foi diferente em cadelas castradas em qualquer altura, comparativamente às que permaneceram inteiras (Philibert et al., 2003). Conclui-se, deste modo, que os resultados dos vários estudos acerca do efeito benéfico da OVH, aquando a mastectomia ou próximo desta, são contraditórios (Euler, 2011).

## **2.5.2. Terapia adjuvante**

### **2.5.2.1. Quimioterapia**

A quimioterapia é a principal modalidade terapêutica para a doença oncológica sistémica, como no caso de metastização de tumores sólidos. Em Medicina Veterinária, a quimioterapia é geralmente utilizada como tratamento paliativo, o qual tem por objetivo melhorar a qualidade de vida do paciente (Frimberger, 2005). O benefício dos citotóxicos no tratamento do TMC não tem sido claramente documentado em Medicina Veterinária. No entanto, com base em protocolos utilizados na Mulher, vários agentes quimioterápicos têm sido usados na cadela para o tratamento de carcinomas de alto grau de malignidade ou metastáticos. Os fármacos mais utilizados incluem a ciclofosfamida, doxorrubicina, gemcitabina, taxanos, carboplatina, mitoxantrona e fluorouracil (Euler, 2011; Henry, 2009).

Num estudo de Karayannopoulou, Kaldrymidou, Constantinidis e Dessiris (2001), as cadelas submetidas a excisão cirúrgica e a protocolo de quimioterapia com combinação de ciclofosfamida e 5- fluorouracil, apresentaram um aumento do tempo de sobrevivência total (OS – overall survival) e do tempo livre de doença (DFS – disease-free survival), em comparação com as cadelas submetidas apenas a extirpação dos tumores.

Noutro estudo, datado de 2006, em que se analisou o efeito do uso de doxorrubicina ou de docetaxel no tratamento adjuvante de tumores de alto grau, não foi constatado um efeito benéfico significativo (Simon, Schoenrock, Baumgartner & Nolte, 2006).

É importante referir que os carcinomas são muito menos responsivos à quimioterapia do que os sarcomas, sendo que a sua generalidade não responde favoravelmente aos citotóxicos. Esta modalidade terapêutica pode ser considerada para os casos em que a cirurgia ou radioterapia não são opções viáveis, devido à extensão ou inacessibilidade do tumor primário; ou nos casos em que ocorreu metastização local ou distante (Dobson, 1993).

### **2.5.2.2. Radioterapia**

Apesar de ser o tratamento de eleição para alguns subtipos de cancro de mama na Mulher, esta modalidade terapêutica permanece muito pouco explorada para o tratamento do TMC e não existem dados consistentes relativamente à sua eficácia (Euler, 2011; Henry, 2009). Contudo, os carcinomas são muito mais responsivos à radioterapia do que os sarcomas. Assim, o tratamento radioterápico pode apresentar-se como uma boa alternativa às situações em que a remoção cirúrgica não é exequível (Dobson, 1993).

### **2.5.2.3. Terapia hormonal**

Como referido anteriormente, não existe consenso em relação ao benefício da ovariectomia como tratamento adjuvante para o TMC (Euler, 2011). Taylor et al. (1976) não verificaram a existência de efeitos benéficos decorrentes da realização de ovariectomia como terapia adjuvante em cadelas com idade superior a 4 anos, com tumores mamários metastáticos (TMM's). Estes autores concluíram que após os 4 anos de idade, a presença ou ausência dos ovários não influencia o comportamento biológico do TM em fase avançada. O facto de não estarem descritas vantagens significativas não é surpreendente, tendo em conta que a maioria das metástases não apresenta recetores hormonais (Misdorp, 2002).

O uso de terapia hormonal em cadelas com TM é incomparavelmente inferior à sua utilização na Mulher, devido à dificuldade em se realizar de forma rotineira testes que avaliem a expressão de RE e RP nos TMC's (Henry, 2009). Compostos antiestrogénicos como o tamoxifeno são muito úteis no tratamento de TM's positivos para RE, pois adiam a recorrência e a metastização de TM's na Mulher (Henry, 2009; Morris & Dobson, 2001). Porém, na cadela, o tamoxifeno é metabolizado em compostos estrogénicos, causando efeitos adversos como piómetra, edema vulvar, corrimento vaginal, incontinência, manifestações de estro e infeções do trato urinário (Morris, Dobson & Bostock, 1993). Relativamente aos antagonistas da progesterona, a aglepristona (bloqueador dos RP), induz uma diminuição da proliferação em carcinomas mamários caninos positivos para RP (Guil-Luna et al., 2011).

Foi também demonstrado o efeito inibitório da desmopressina na metastização nos linfonodos e pulmões em cadelas com TM. A administração intravenosa deste fármaco, no pré e pós-operatório, resulta num aumento significativo da OS e DFS, sem ocorrência de efeitos secundários (Sleeckx et al., 2011).

### **2.5.2.4. Imunoterapia**

Têm sido investigadas diversas abordagens imunomoduladoras não específicas para o tratamento do TMC, sem benefícios consistentes (Henry, 2009). Neste campo, foram testadas

vacinas com *bacillus Calmette-Guérin* (BCG) e *Corynebacterium parvum*, administradas em cadelas com TM antes da mastectomia, sem melhoria da OS (Misdorp, 2002).

Num estudo recente, verificou-se uma resposta imune adaptativa forte contra antigénios (Ag) tumorais, transcriptase reversa da telomerase e antirreceptor HER-2, despoletada pela administração de vacinas do tipo *Ad6-based* e *DNA-EP* (Peruzzi, Mesiti, Ciliberto, La Monica & Aurisicchio, 2010).

## **2.6. Prognóstico**

O prognóstico é frequentemente expresso como a percentagem de animais vivos 1 ou 2 anos após a primeira mastectomia (Misdorp, 2002), ou através da OS, que se refere ao tempo decorrido desde a cirurgia até ao momento da morte (Sleekx et al., 2011). Porém, o tempo de sobrevivência é um parâmetro de difícil determinação em Medicina Veterinária devido ao facto da eutanásia ser uma opção frequente por parte dos donos. Desta forma, o período de ausência do processo neoplásico identificável – *disease free interval* – ou o risco de desenvolvimento de novas lesões neoplásicas, o qual depende exclusivamente do estágio da doença e agressividade do tumor primário é, geralmente, o *endpoint* mais adequado para estudos prognósticos dos TMC's (Matos, Baptista, Gartner & Rutteman, 2012; Misdorp, 2002; Peleteiro, 1994).

Clinicamente, os três fatores mais fortemente associados ao prognóstico são o tamanho do tumor, o envolvimento dos linfonodos e o estadiamento clínico. A expressão de recetores hormonais, o grau de malignidade e o tipo histológico também proporcionam informação prognóstica importante (Sorenmo et al., 2013).

### **2.6.1. Tamanho tumoral**

De acordo com Lana et al. (2007), cães com tumores de diâmetro inferior a 3 cm (classificados como T1 de acordo com sistema TMN) apresentam um prognóstico significativamente melhor do que aqueles com tumores de maior dimensão. Outros autores referem também um tempo de sobrevida maior em cadelas com tumores de tamanho inferior a 3 cm (Martín de Las Mulas et al., 2005; Philibert et al., 2003; Santos et al., 2013), enquanto alguns sugerem um prognóstico desfavorável para cadelas com tumores de diâmetro superior a 5 cm (Bostock, 1975; Yamagami, Kobayashi, Takahashi & Sugiyama, 1996). É provável que a evolução desfavorável do prognóstico ocorra gradualmente à medida que o tamanho aumenta (Sorenmo et al., 2011). Por outro lado, o tamanho tumoral deixa de ser um fator de prognóstico relevante no caso de já existir envolvimento dos linfonodos regionais (Sorenmo

et al., 2013), sendo que a ocorrência de metastização para os linfonodos adjacentes foi associada a tumores com tamanho superior a 5 cm (Chang, Chang, Chang & Wong, 2005).

### **2.6.2. Envolvimento dos linfonodos**

Vários estudos associam a presença de metástases nos linfonodos regionais a um prognóstico desfavorável (Chang et al., 2005; Hellmen et al., 1993; Martín de Las Mulas et al., 2005; Santos et al., 2013; Yamagami et al., 1996), enquanto outros autores não lhe atribuem valor prognóstico (Sartin, Barnes, Kwapien & Wolf, 1992).

Num estudo de Karayannopoulou, Kaldrymidou, Constantinidis e Dessiris (2005), obteve-se uma taxa de mortalidade de 85,7% para as cadelas com carcinomas simples e que apresentaram os linfonodos infiltrados com metástases, 2 anos após a mastectomia; e de 21,1% para as que não apresentaram metastização, evidenciando também a relevância deste fator prognóstico.

Deste modo, é extremamente importante obter informação relativa ao envolvimento dos linfonodos na escolha de terapia adjuvante e sistêmica (Sorenmo et al., 2013).

### **2.6.3. Estadiamento do tumor**

O sistema TNM permite avaliar a extensão do processo tumoral. Esta avaliação tem por base o tamanho do tumor e o grau de infiltração nos tecidos circundantes (Misdorp, 2002; Sorenmo et al., 2013). Um estudo de Philibert e colegas (2003) demonstrou que as cadelas com tumores incluídos no estágio I do sistema de classificação TNM apresentaram, após a mastectomia, um período médio de sobrevivência de 24 meses, comparativamente a períodos de 19, 15 e 12 meses em cadelas com tumores dos estádios II, III e IV, respetivamente. Outros autores demonstraram também uma correlação positiva entre fases mais avançadas da doença e um prognóstico mais desfavorável (Chang et al., 2005; Yamagami et al., 1996).

### **2.6.4. Expressão de recetores hormonais**

A expressão de RE e RP é menor nos TM's malignos, quando comparada com tumores benignos (Nieto et al., 2000; Rutteman, Misdorp, Blankenstein & van den Brom, 1988). Níveis proteicos diminuídos de RE foram associados a tumores classificados como N1 (com envolvimento dos linfonodos regionais) (Nieto et al., 2000). De forma semelhante, Martín de Las Mulas et al. (2005) encontraram níveis de expressão elevados, em um ou em ambos recetores, em tumores sem envolvimento dos linfonodos regionais. Em contraste, Rutteman et al. (1988) não obtiveram uma associação estatisticamente significativa entre a expressão de recetores hormonais em tumores mamários primários (TMP's) e a expressão destes recetores

em tumores com envolvimento dos linfonodos regionais, tendo esta correlação apenas sido verificada em tumores com metástases distantes.

### **2.6.5. Grau de malignidade e tipo histológico**

O prognóstico está intimamente relacionado com o nível de diferenciação tumoral. Os tumores malignos com melhor prognóstico apresentam uma boa diferenciação, enquanto os menos diferenciados (anaplásicos), e com maior grau de malignidade, estão associados a pior prognóstico (Euler, 2011; Karayannopoulou et al., 2005; Martín de Las Mulas et al., 2005).

No que respeita ao grau de malignidade, cadelas com carcinomas mamários de grau III têm um tempo de sobrevida mais curto, em comparação com animais que tenham tumores de grau I e II (Karayannopoulou et al., 2005; Santos et al., 2013).

Relativamente ao tipo histológico, Philibert et al. (2003) relataram um período de sobrevida, após a mastectomia, de 2,5 meses em cadelas com carcinomas anaplásicos, comparativamente a períodos de 21 e de 16 meses em animais com adenocarcinoma e carcinoma sólido, respetivamente. Outros autores indicam os carcinosarcomas como os tumores mais agressivos, com maior frequência de recorrência local e de metastização (Benjamin, Lee & Saunders, 1999; Santos et al., 2013). No que concerne aos sarcomas, este tipo histológico tem uma influência negativa no tempo de sobrevida, estatisticamente significativa (Hellmen et al., 1993). Estes tumores são muito agressivos e apresentam um prognóstico semelhante aos carcinomas anaplásicos (Euler, 2011).

## **3. Classificação molecular dos tumores mamários**

### **3.1. Classificação molecular na Mulher**

Durante décadas, os sistemas clássicos de classificação dos TM's basearam-se apenas na aparência histológica dos tumores. Com efeito, os critérios de diagnóstico utilizados para a caracterização de cada entidade implicam algum grau de subjetividade, sendo que a informação relativa ao subtipo histológico tem um impacto limitado na decisão terapêutica. Neste momento, a atual organização dos TM's em subgrupos com significado clínico é baseada em parâmetros prognósticos clínico-histopatológicos para além do tipo histológico, tais como o grau histológico, envolvimento dos linfonodos e invasão linfo-vascular (Guiu et al., 2012).

Devido ao limitado valor prognóstico e preditivo das classificações existentes, novas abordagens têm vindo a ser consideradas no estudo das bases moleculares da heterogeneidade dos TM's (Viale, 2012). Assim, os TM's são também classificados quanto ao seu *status* hormonal no que respeita à expressão dos RE, RP e do HER-2 (Guiu et al., 2012; Graveel,

Calderone, Westerhuis, Winn & Sempere, 2015). Adicionalmente, graças aos avanços tecnológicos verificados na Biologia Molecular, no que respeita ao desenvolvimento de técnicas de qRT-PCR (*Real-time polymerase chain reaction* - reação de polimerase em cadeia em tempo real) e de *microarray* (cADN microarray) têm permitido à testagem de numerosos biomarcadores e, conseqüentemente, têm promovido a obtenção de uma classificação mais detalhada dos TM's, contribuindo, assim, para a formulação de um prognóstico mais correto e para incrementar o valor preditivo relativamente à abordagem terapêutica empregue (De Abreu, Wells & Tsongalis, 2013).

Perou et al. (2000) classificaram os TM's em subtipos moleculares, tendo por base uma análise *hierarchical clustering*, que agrupa os genes de acordo com as suas semelhanças e quanto aos seus padrões de expressão génica. Deste estudo resultou a divisão dos TM's em quatro subtipos moleculares (*Luminal*, *Basal-Like*, *Normal-breast* e *HER-2-positive*).

Um ano mais tarde, Sørlie et al. (2001) reagruparam os TM's em 5 grupos (*Luminal A*, *Luminal B*, *Basal-like*, *Normal-like* e *HER-2-positive*). Posteriormente, um novo subtipo molecular - *Claudin-low* - foi descrito (Herschkowitz et al., 2007).

De seguida, apresenta-se uma descrição da classificação molecular dos TM's da Mulher, revista por Eroles, Bosch, Pérez-Fidalgo e Lluch (2012):

a) **Luminal A**: este subtipo de cancro mamário é o mais comum, representando 50% a 60% do total de TM's. O seu perfil imuno-histoquímico caracteriza-se pela sobre-expressão de RE, RP, CK8/18 (citoqueratinas 8 e 18) e Bcl-2 (linfoma de células B 2), pela ausência de expressão de HER-2, pela baixa taxa de proliferação celular e pelo baixo grau de malignidade. Pacientes com este subtipo de cancro têm um bom prognóstico, apresentando uma taxa de recidiva significativamente menor (27,8%) quando comparados com os restantes subtipos. Adicionalmente, o tempo de sobrevida desde o momento da recidiva é também maior (média de 2,2 anos). O tratamento destes pacientes é baseado em inibidores da aromatase de 3ª geração, em moduladores seletivos dos RE (p.ex. tamoxifeno) e em reguladores seletivos puros dos RE (p.ex. fulvestrant).

b) **Luminal B**: este subtipo tumoral representa 10% a 20 % do total de cancros mamários. Em comparação com o subtipo *Luminal A*, caracteriza-se por ter um fenótipo mais agressivo, um grau de malignidade mais elevado, um maior índice de proliferação celular e um pior prognóstico (tempo médio de sobrevida de 1,6 anos após a recidiva). A diferença biológica mais significativa entre este subtipo e o subtipo *Luminal A* é o aumento da expressão de genes relacionados com proliferação, também ocorrendo, frequentemente, sobre-expressão dos

recetores do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e do HER-2. O seu perfil imuno-histoquímico é caracterizado pela expressão de RE e ausência de expressão de HER-2 ou pela expressão de RE e de HER-2. Contudo, esta definição não abrange a totalidade dos tumores do tipo *Luminal B*, sendo que cerca de 6% destes tumores são RE-/HER-2-. Os tumores deste subtipo respondem melhor à quimioterapia neoadjuvante que os tumores do subtipo *Luminal A* (resposta completa em 17% dos casos para o subtipo *Luminal B* e em 7% dos casos para o subtipo *Luminal A*).

c) **HER-2 positivo:** este subtipo molecular corresponde entre 15% a 20% dos cancros mamários na Mulher. Estes tumores caracterizam-se pela sobre-expressão do gene HER-2 e de outros genes relacionados com a proliferação celular. Morfologicamente, são tumores altamente proliferativos (75% apresentam um grau de malignidade mais elevado e mais de 40% têm mutações no gene p53). O seu perfil imuno-histoquímico caracteriza-se pela sobre-expressão de HER-2 e pela ausência de expressão de RE. Clinicamente, estes tumores são caracterizados por terem um prognóstico pobre apesar de, nos últimos anos, as terapias anti-HER-2 terem resultado num aumento substancial da sobrevivência destes pacientes. Também apresentam uma boa resposta à quimioterapia neoadjuvante. Os tumores com amplificação do HER-2 foram classificados em três subgrupos distintos, um dos quais com uma taxa de sobrevida a 10 anos de 12%, em comparação com uma sobrevivência de 50% a 55% nos restantes dois grupos. Este facto deu origem ao desenvolvimento de um *array* composto por 158 genes (*HER-2- derived prognostic predictor - HDPP*), no sentido de melhor estratificar este subtipo quanto ao seu prognóstico.

d) **Basal-like:** representa 10% a 20 % do total de TM's. Uma das características mais relevantes deste subtipo é a ausência de expressão dos três recetores principais anteriormente referidos (RE, RP e HER-2), pelo que são designados *Triple Negative*. Encontram-se, neste subtipo, os tumores RE-, RP-, HER-2-, EGFR+, CK5/6+.

Do ponto de vista clínico, estes tumores caracterizam-se pelo surgimento em idade precoce, pelo elevado tamanho tumoral aquando do diagnóstico, pelo elevado grau de malignidade e pela elevada frequência de envolvimento dos linfonodos. O seu padrão metastático é agressivo, predominando em órgãos viscerais como o pulmão, o sistema nervoso e os linfonodos. Este subtipo possui, ainda, um prognóstico mais desfavorável do que os subtipos luminais, apresentando uma taxa de recidiva mais elevada nos 3 primeiros anos, apesar da sua resposta favorável à quimioterapia.

Frequentemente, estes tumores apresentam mutações no gene p53, o que pode explicar a sua elevada agressividade e mau prognóstico. Adicionalmente, mutações do gene BRCA1 predisõem para o desenvolvimento de tumores *basal-like*, ausência de expressão de RE e pior prognóstico. Consequentemente, uma das estratégias mais promissoras no tratamento destes tumores é o uso de inibidores da poli-ADP ribosepolimerase-1 (PARP-1), que desempenha um papel fundamental na reparação de defeitos no ADN. A inibição da PARP-1, no contexto da reparação deficiente do ADN pelo BRCA1 que ocorre nas células tumorais afetadas, conduz à acumulação de erros no ADN e à morte celular.

e) **Normal breast**: representa 5% a 10% do total de TM's. Estes tumores estão ainda mal caracterizados, mas sabe-se que expressam genes característicos do tecido adiposo. Apresentam um prognóstico intermédio entre os subtipos *luminal* e *basal-like* e, em regra, não respondem favoravelmente à quimioterapia neoadjuvante. À semelhança dos tumores *basal-like*, também podem ser classificados como *Triple Negative* devido à ausência de expressão de RE, RP e HER-2, não se confundindo com os outros, pois são CK5- e EGFR-. A relevância clínica destes tumores não está ainda bem determinada, dado não existirem estudos suficientes devido à raridade deste subtipo tumoral. Aliás, alguns investigadores duvidam da real existência deste subtipo, sugerindo que não passa de um artefacto técnico devido a contaminação elevada com tecido normal durante a realização dos *microarrays*.

f) **Claudin-low**: representa 12% a 14% dos TM's. Este grupo de tumores caracteriza-se por mostrar uma baixa expressão dos genes envolvidos nas junções oclusivas e na adesão intercelular, como a claudina-3, -4, -7, cingulina, ocludina e a E-caderina. Estes tumores mostram também uma baixa expressão de RE, RP e HER-2 existindo, em cerca de 20% dos casos, marcação positiva para os recetores hormonais, à semelhança do verificado com os tumores do grupo *basal-like*. O prognóstico associado a estes tumores é pobre e a resposta à quimioterapia neoadjuvante é muitas vezes reduzida (apresenta valores intermédios entre os subtipos *luminal* e *basal-like*).

Para a determinação destes subtipos existem vários testes comerciais disponíveis, como o Mamaprint® e o Oncotype DX®. Através destas plataformas que utilizam a tecnologia de qRT-PCR ou de *microarrays*, são identificados alvos génicos com valor terapêutico preditivo (De Abreu et al., 2013).

### 3.2. Classificação molecular na cadela

Nos últimos anos, em Medicina Veterinária, tem-se verificado um interesse crescente no estudo do perfil de expressão proteica dos TMC's, o qual parece ter um papel crucial, na oncologia humana, na determinação do percurso clínico da doença e na prescrição de terapia (quimioterapia e terapia hormonal) e seus efeitos (Beha et al., 2012).

Gama, Alves e Schmitt (2008), tendo por base a classificação do perfil de expressão génica na Mulher, identificaram, através da técnica de IHQ, quatro subtipos de carcinomas mamários caninos: *Luminal A*, *Luminal B*, HER-2 positivo (HER-2+) e *Basal-like*. Para esta classificação foram utilizados cinco marcadores moleculares (RE, HER-2, CK5, p63 e P-caderina). Deste modo, os subtipos luminais foram caracterizados pela positividade em relação ao RE e subdivididos em *Luminal A* e *Luminal B*, no caso de serem negativos ou positivos para o recetor HER-2, respetivamente. O fenótipo *Basal-like* foi caracterizado pela ausência de recetores hormonais e pela expressão de CK5, p63 e P-caderina; a positividade para o recetor HER-2, no grupo dos tumores *basal-like*, caracterizou os tumores HER-2+. Neste estudo, o subtipo *Luminal A* (44,8%) correlacionou-se com um grau de malignidade baixo (I ou II) e baixa taxa de proliferação celular, enquanto que o subtipo *Basal-like* (29,2%) foi o mais frequente, em tumores de elevado grau de malignidade (III), mostrando elevada taxa de proliferação, menor taxa de OS e DFS.

Mais tarde, Sassi, Benazzi, Castellani e Sarli (2010) identificaram três subtipos moleculares (*Luminal A*, *Luminal B* e *Basal-like*), tendo para isso utilizado um painel de cinco anticorpos (Ac) dirigidos contra os RE, RP, HER-2, CK14 e CK5/6. Neste estudo, observou-se uma associação entre o subtipo *Luminal A* (29%) com tumores de grau I e o subtipo *Luminal B* (49%) com tumores de grau II e III. Em contraste com o estudo de Gama et al. (2008), não foram identificados tumores HER-2+ e não foi observada correlação entre a classificação molecular dos tumores e a sobrevivência. Em ambos os estudos mencionados salienta-se o facto do subtipo *Normal-like* (identificado na Mulher por Sørli et al, 2003) estar ausente.

Neste sentido, Kim e colegas (2013) tencionaram identificar o fenótipo *Triple Negative* nos TMC's e encontrar alguma diferenciação com o subtipo *Basal-like*, baseando-se na expressão de quatro marcadores basais diferentes (CK5/6, CK14, p63 e EGFR). No total, 241 carcinomas mamários caninos foram classificados nos grupos *Triple Negative* e *Non-triple Negative*, de acordo com a expressão de RE, RP e HER-2. A percentagem obtida de tumores *Triple Negative* foi de 18,7% e de 81,3% para os tumores *Non-triple Negative*. No grupo dos tumores *Triple Negative*, 91,1% corresponderam ao subtipo *Basal-like* e 8,9% ao subtipo *Normal-like*. Assim, estes autores concluíram que o fenótipo *Triple Negative* tem características distintas, que se relacionam com um prognóstico desfavorável, e sugerem a

realização de mais estudos para confirmar a existência do subtipo *Basal-like* como entidade separada.

É importante referir que, nos últimos tempos, a tendência verificada em Medicina Humana aponta no sentido da aplicação da classificação molecular usada nos tumores primários, também nas metástases presentes nos linfonodos sentinela (Beha et al., 2012). A relação entre a expressão molecular dos TMP's e as suas respetivas metástases foi avaliada num estudo de Wu et al. (2008), no qual se observou extensa heterogeneidade entre ambas as entidades.

Em Medicina Veterinária, num estudo que englobou 20 cadelas com carcinomas mamários, Beha et al. (2012) identificaram uma discordância de 35% entre o perfil fenotípico do tumor primário e o fenótipo das metástases nos linfonodos. Estes autores sugerem que, no seio do tumor primário, a seleção de uma subpopulação de células com maior agressividade e capacidade de metastização estará na base da ocorrência de uma evolução fenotípica associada a pior prognóstico. Este fenómeno apoia a heterogeneidade morfológica e biológica, tão característica e relevante nos TMC's (Gama et al., 2008; Peleteiro, 1994), remetendo para a importância da classificação molecular das metástases nos linfonodos, no sentido de uma melhor avaliação do prognóstico e adequação da abordagem terapêutica (Beha et al., 2012; Wu et al., 2008).

#### **4. Recetor do Fator de Crescimento Epidérmico Tipo II (HER-2)**

O oncogene HER-2, também referido como HER-2/*neu* ou c-erbB-2, codifica para um recetor do fator de crescimento epidérmico pertencente à família EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) ou família HER (Ross et al., 2004). Esta família de recetores de tirosina quinase (TQ) é constituída por quatro elementos (HER-1, HER-2, HER-3 e HER-4), que têm um papel essencial na regulação da proliferação celular, da sobrevivência, da diferenciação e da migração, participando em vários aspetos do desenvolvimento dos mamíferos e na manutenção da normal função dos tecidos no adulto. A perda da regulação por parte destes recetores tem com consequência o surgimento de várias doenças, com destaque para o cancro (Bazley & Gullick, 2005; Wieduwilt & Moasser, 2008).

O papel oncogénico do HER-2 foi, inicialmente, descrito em ratos com neuroblastomas induzidos quimicamente. Este proto-oncogene, homólogo do HER-2 humano, foi então denominado *neu* (Moasser, 2007; Wieduwilt & Moasser, 2007). Pouco tempo após a descrição do potencial transformador do HER-2, descobriu-se a sua amplificação em linhas celulares de um carcinoma mamário humano - foi nesta circunstância que o gene recebeu a denominação *Human Epidermal Growth Factor Receptor-2* (HER-2) (King et al., 1985), indicando, igualmente, a proteína que é codificada por ele (Moasser, 2007).

Na verdade, a amplificação do gene HER-2 (mais do que as duas cópias normais) e a sobre-expressão da proteína ocorrem em 25% a 30% dos cancros de mama (Slamon et al., 1987; Slamon et al., 1989). Nestes tumores pode haver 25 a 50 cópias do gene, resultando na expressão de até 2 milhões de recetores na superfície da célula tumoral (Kallioniemi et al., 1992). Os estudos existentes sugerem que a amplificação do gene HER-2 se mantém ao longo da progressão tumoral para doença invasiva, metástases nos linfonodos e metástases à distância (Carlsson et al. 2004; Park, Han, Kim, Kim & Shin, 2006; Weigelt et al., 2005). Contudo, é importante referir que está descrita alguma discordância do *status* HER-2, no mesmo paciente, que é mais significativa entre o TMP e as metástases à distância (Houssami, Macaskill, Balleine, Bilous & Pegram, 2011).

Por outro lado, a amplificação do gene HER-2 é um evento precoce na tumorigénese mamária, definindo um subtipo de cancro mamário que se caracteriza por apresentar pior prognóstico, maior propensão para a progressão, elevada sensibilidade a certos agentes quimioterápicos citotóxicos (como a doxorrubicina) e resistência a inibidores hormonais (Gutierrez & Schiff, 2011; Moasser, 2007; Ross et al., 2009).

#### **4.1. Papel fisiológico**

Como anteriormente referido, os recetores da família HER estão envolvidos na regulação de vários processos celulares. Com algumas exceções, como por exemplo as células hematopoiéticas, estas proteínas são expressas em células de origem mesodérmica e ectodérmica (Real et al., 1986; Yarden & Sliwkowski, 2001). Cada recetor HER tem uma participação crítica no desenvolvimento de múltiplos órgãos, incluindo o cérebro, pele, pulmões e trato gastrointestinal (Gassmann et al., 1995; Miettinen et al., 1995; Sibilía, Steinbach, Stingl, Aguzzi & Wagner, 1998).

Especificamente em relação ao HER-2, níveis baixos são normalmente expressos em células epiteliais de vários tecidos, nomeadamente na glândula mamária, ovários, trato gastrointestinal, pulmões, rins, placenta e pele (Natali et al., 1990; Press, Cordon-Cardo & Slamon, 1990). É também curioso o facto de haver sobre-expressão do HER-2 nas células epiteliais fetais e nos trofoblastos placentários, nas fases finais da diferenciação trofoblástica (Mielke, Meden & Kuhn, 1998).

Em paralelo, o papel do HER-2 no desenvolvimento cardíaco parece ser essencial, sendo que em ratos *knockout* para este gene ocorre mortalidade embrionária devido a anomalias cardíacas graves (Burden & Yarden, 1997; Erickson et al., 1997; Lee et al., 1995). Um estudo em ratinhos adultos também demonstrou que a perda da expressão do HER-2 nos cardiomiócitos pode causar cardiomiopatia dilatada. Tendo em conta que as mulheres com

TM HER-2+ são submetidas a terapias anti-HER-2, é expectável que esta sequela seja dos principais efeitos secundários desta terapia (Garratt, Ozcelik & Birchmeier, 2003).

A participação do HER-2 é também essencial no desenvolvimento neuronal, nomeadamente do sistema nervoso periférico (SNP) e do sistema nervoso simpático (SNS) (Britsch et al., 1998; Morris et al., 1999).

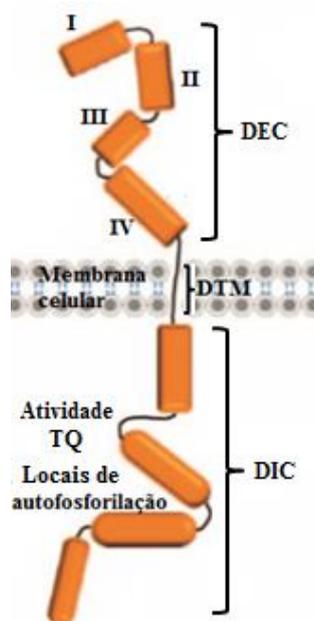
A nível da glândula mamária, em termos fisiológicos, a ausência de expressão do HER-2 nas fases iniciais da morfogénese mamária implica alterações graves, que se traduzem por um desenvolvimento deficiente dos lóbulos e dos alvéolos e reduzida secreção de leite (Andrechek, White & Muller 2005; Jones & Stern, 1999).

#### 4.2. Localização genómica e conformação molecular

Na espécie humana, o gene HER-2 está localizado no cromossoma 17q21.1 e codifica uma glicoproteína transmembranar com um peso molecular de 185 kDa (Akiyama, Sudo, Ogawara, Toyoshima & Yamamoto, 1986).

Na espécie canina, o gene HER-2 está localizado no cromossoma 1q13.1 (Escobar, Becker, Bullerdiek & Nolte, 2001) e codifica para uma proteína com 1259 aminoácidos (Aa) (GenBank, 2015). Com efeito, Singer et al. (2012) encontraram uma homologia de 92% entre a sequência de Aa correspondente ao recetor HER-2 canino e o seu homólogo humano.

Figura 3 – Estrutura molecular do HER-2 (adaptado de Zagodzón et al., 2011).



A estrutura molecular do HER-2 (Figura 3) consiste num domínio intracelular (DIC), num domínio transmembranar (DTM) e num domínio extracelular (DEC) (Cho et al., 2003; Moasser, 2007). O DIC tem atividade de TQ e uma

estrutura bilobada formada pelas extremidades C-terminal e N-terminal (Wieduwilt & Moasser, 2008). A cauda C-terminal contém resíduos de tirosina que interagem com mensageiros moleculares responsáveis pela propagação das vias de sinalização. A interação entre o lobo N-terminal e o lobo C-terminal despoleta a atividade TQ (Zhang, Gureasko, Chen, Cole & Kuriyan, 2006).

O DEC exhibe quatro subdomínios: L1 (I), S1/CR1 (II), L2 (III) e S2/CR2 (IV) (Bazley & Gullick, 2005; Lax et al., 1989). Os subdomínios I e III do HER-2 encontram-se muito próximos, em comparação à proximidade destes domínios (responsáveis pela ligação do ligando) nos restantes recetores HER. Esta proximidade

resulta num contacto direto substancial e numa forte interação entre ambos, originando um “braço de dimerização” que impossibilita a ligação de ligandos ao HER-2, mas que viabiliza a

permanente disponibilidade deste recetor para dimerizar (Citri & Yarden, 2006; Garret et al., 2003). De facto, é o processo de dimerização que permite a ativação deste recetor - processo que será abordado de seguida.

### **4.3. Mecanismo de ação**

A ativação do HER-2 ocorre de duas formas distintas:

A primeira refere-se à dimerização do HER-2 com outros recetores da família HER (Figura 4), ou consigo próprio, para formar heterodímeros ou homodímeros, respetivamente (Alroy & Yarden, 1997; Rubin & Yarden, 2001). Este fenómeno está dependente da ligação de ligandos aos recetores HER e é essencial para o aumento da atividade intracelular intrínseca de TQ, que conduz à fosforilação dos resíduos tirosina presentes na cauda C-terminal do DIC (Bazley & Gullick, 2005; Zhang et al., 2006). Estes resíduos interagem, então, com segundos mensageiros de forma a induzir uma resposta biológica específica, que resulta da expressão coordenada de numerosos genes reguladores de aspetos fundamentais da biologia celular como a sobrevivência, a proliferação, a migração e a diferenciação (Bazley & Gullick, 2005; Citri & Yarden, 2006). Efetivamente, já foram identificados vários fatores de crescimento (ligandos), entre os quais: fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ), anfiregulina, betacelulina; fator de crescimento epidérmico ligado à heparina (HB-EGF), epiregulina e várias neuroregulinas (1, 2, 3 e 4) (Hynes & Lane, 2005; Jones, Akita & Sliwkowski, 1999).

A dimerização é preferida, pois implica uma maior estabilidade do complexo formado entre o ligando e os dois recetores, em comparação com a forma monomérica (Alroy & Yarden, 1997). No entanto, não existe nenhum ligando conhecido que consiga promover a homodimerização do HER-2, o que sugere que este recetor não possui qualquer ligando que se fixe diretamente à sua estrutura (Rubin & Yarden, 2001). Apesar de não ser conhecido um ligando específico para o HER-2, este é o parceiro preferencial e o coreceptor universal dos restantes membros para o processo de dimerização (Cho et al., 2003; Tzahar et al., 1996). De facto, este recetor pode interagir com os restantes recetores, dado que o seu DEC disponibiliza, de forma constante, um “braço de dimerização” que lhe confere uma conformação aberta prontamente ativa (Citri & Yarden, 2006; Garret et al., 2003). Consistentemente com a sua conformação constitutivamente ativa, o HER-2 não possui atividade dependente de ligando e a sua função sinalizadora é então iniciada através dos parceiros heterodiméricos (Sliwkowski, 2003).

É importante realçar que os heterodímeros com o HER-2 se caracterizam por um potencial de sinalização muito elevado (Alroy & Yarden, 1997), que é explicado por duas razões: em

primeiro lugar, o HER-2 tem potencial para reduzir a taxa de dissociação do ligando, o que resulta em sinais celulares mais potentes e com maior duração (Graus-Porta, Beerli & Hynes, 1995); a segunda razão prende-se com o facto da presença do HER-2 aumentar o potencial mitogénico (Ben-Levy, Paterson, Marshall & Yarden, 1994).

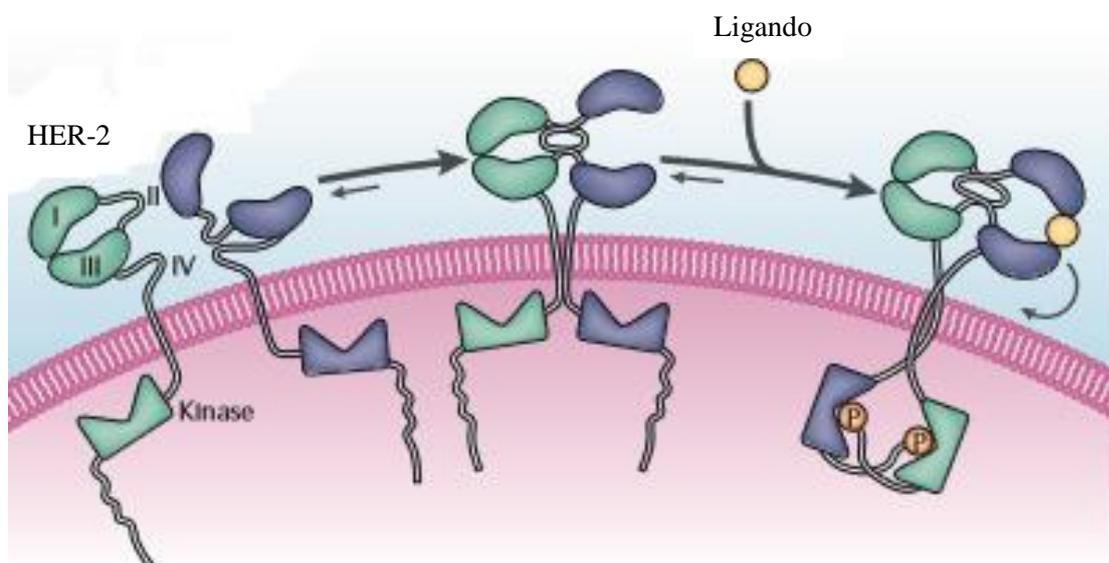
Adicionalmente, o HER-2 apresenta uma característica única quando comparado com outros recetores HER - quando em abundância, apresenta uma forte tendência para formar homodímeros e para iniciar sinalização intracelular de uma forma independente de ligandos. Esta sinalização aumenta significativamente o potencial de transformação maligna das células com sobre-expressão do HER-2 (Zagodzdon, Gallagher & Crown, 2011).

A segunda forma de ativação do HER-2 é induzida por fragmentos carboxilo-terminais (*carboxy-terminal fragments*, CTF), que retêm atividade de TQ e podem ser gerados por dois mecanismos independentes (Tsé, Gauchez, Jacot & Lamy, 2012).

Por um lado, a iniciação alternativa da tradução a partir da metionina 611 ou 687 do transcrito do HER-2 gera dois fragmentos (611-CTF ou 687-CTF). Estes fragmentos não possuem o DEC que permite a dimerização e subseqüente a ativação do HER-2 na sua forma intacta. É motivo de destaque o papel do fragmento 611-CTF, forma hiperativa do HER-2, capaz de homodimerização, o qual promove a progressão dos TM's e a metastização (Pedersen et al., 2009).

O segundo mecanismo, através do fenómeno de *shedding*, será abordado no capítulo referente ao sHER-2 (forma sérica do recetor HER-2).

Figura 4 – Representação esquemática do processo de dimerização do recetor HER-2 com os restantes recetores HER da mesma família (adaptado de Citri & Yarden, 2006).



#### **4.4. Importância do diagnóstico do TM HER-2+**

A necessidade da correta determinação do *status* HER-2 é inerente aos excelentes resultados das terapias anti-HER-2 na prática clínica (Gutierrez & Schiff, 2011). Neste contexto, o valor preditivo da resposta à terapêutica deste marcador, em associação com o seu valor prognóstico, são pontos fundamentais que serão abordados de seguida.

##### **4.4.1. Valor prognóstico**

Um dos primeiros estudos a avaliar o valor prognóstico da expressão do HER-2 em TM's na Mulher foi apresentado por Slamon et al. (1987). Estes autores concluíram que o grau de amplificação do gene HER-2 era um fator de prognóstico significativo para a OS e DFS, em pacientes com cancro mamário primário. Quanto maior o nível de amplificação encontrado, mais forte e estatisticamente significativa foi a correlação com a diminuição de ambos os indicadores referidos.

Foi, portanto, naturalmente expectável que um vasto número de publicações se tenha seguido com o mesmo intuito, o de compreender as consequências biológicas da expressão do HER-2 nos TM's. Tendo em conta a enorme quantidade de estudos disponíveis, e de forma a sintetizar os pontos mais importantes para a compreensão deste tópico, serão referidas apenas revisões bibliográficas acerca desta matéria.

Numa revisão bibliográfica que englobou 47 estudos e mais de 15 000 pacientes (Ross & Fletcher, 1998), 88% dos estudos analisados demonstraram que a amplificação ou sobre-expressão do HER-2 se correlacionava com um pior prognóstico em pacientes com cancro mamário. Curiosamente, outra revisão mais recente (Ross et al., 2009) que incluiu 107 publicações envolvendo um total de 39 730 pacientes demonstrou uma percentagem equivalente de publicações nas quais a amplificação do gene HER-2 ou a sua sobre-expressão a nível proteico se correlacionou com um *outcome* pior.

Adicionalmente, outras características clínicas e biológicas têm sido associadas aos TM's HER-2+, tais como: elevada taxa de proliferação celular; alto grau histológico; baixa expressão de RE e RP; aneuploidia do ADN; mutações em p53; amplificação da topoisomerase II-alfa (TOPII $\alpha$ ); e propensão para metastizar no sistema nervoso central (SNC) e vísceras (Gutierrez & Schiff, 2011; Moasser, 2007; Ross et al., 2003). É interessante a referência ao facto da maior suscetibilidade à metastização no SNC ser decorrente das terapias anti-HER-2 largamente implementadas nos dias de hoje, em contraste com a diminuição da incidência de metástases nos órgãos viscerais como os pulmões, linfonodos axilares, fígado, medula óssea, adrenais e ovários (Lin & Winer, 2007; Ross et al., 2009; Spigel & Burstein, 2002). Aparentemente, o SNC é um alvo preferencial dada a inabilidade

do trastuzumab, um Ac anti-HER-2 eficaz no controlo de doença visceral, em ultrapassar a barreira hematoencefálica (Lin & Winer, 2007).

#### **4.4.2. Terapêutica/Valor preditivo da resposta à terapêutica**

Atualmente, os agentes terapêuticos anti-HER-2 aprovados pela FDA (Food and Drug Administration) incluem o trastuzumab, o lapatinib e o pertuzumab (Chung & Christianson, 2014), sendo que as melhorias na sobrevivência até hoje documentadas são decorrentes dos regimes com trastuzumab, lapatinib, e combinação do trastuzumab e pertuzumab (Zhu & Verma, 2015).

O trastuzumab é um Ac monoclonal direcionado contra o subdomínio IV do DEC do HER-2, estando a sua ação dependente desta ligação, a qual resulta na inibição do crescimento das células tumorais através de uma diversidade de mecanismos (Saini et al., 2011; Wang, Lei, Mei, Wang, 2015). O valor preditivo do HER-2 na resposta ao trastuzumab em pacientes com cancro mamário foi demonstrado em vários contextos, nomeadamente no tratamento neoadjuvante (antes da cirurgia), adjuvante, e aquando da metastização (Chung & Christianson, 2014).

Por seu turno, o lapatinib é um inibidor reversível da atividade TQ do HER-2 e que se liga ao DIC deste recetor (Saini et al., 2011). Apesar de este ser um agente anti-HER-2 eficaz, existem evidências que sugerem que o bloqueio de ambos os domínios DIC e DEC do recetor HER-2 pelo lapatinib e transtuzumab, respetivamente, pode melhorar as taxas relativas do DFS e CBR (*clinical benefit rate*) em pacientes com TMM, comparativamente à monoterapia com lapatinib (Blackwell et al., 2010).

Por último, o pertuzumab é um Ac monoclonal que se liga ao subdomínio II do DEC do HER-2, inibindo a sua heterodimerização com os restantes recetores da mesma família (Saini et al., 2011). Um estudo de Baselga et al. (2010) revelou taxas de 24,2% e 50% para a ORR (*objective response rate*) e CBR, respetivamente, em pacientes com TMM HER-2+ tratados com a combinação trastuzumab/pertuzumab. Os autores deste estudo consideraram que os modos de atuação complementares destes agentes têm como consequência um aumento da atividade antitumoral.

Finalmente, o *status* do HER-2 apresenta um valor preditivo da resposta aos regimes terapêuticos baseados em antraciclina, como a epirubicina e a doxorubicina (Di leo et al., 2002; Di Leo et al., 2011). Tendo em consideração que estes agentes atuam através da inibição da TOPII $\alpha$ , a razão para o benefício decorrente destas terapias estará, provavelmente, relacionada com a amplificação concomitante do gene HER-2 e do gene da TOPII $\alpha$  (Di leo et al., 2002; Järvinen & Liu, 2003).

## 4.5. Diagnóstico do TM HER-2+

### 4.5.1. Diagnóstico ao nível do ADN

A amplificação génica identificada pelas técnicas de hibridização *in situ* representa um dos testes *gold standard* para a determinação do *status* HER-2 (Wolff et al., 2013).

- FISH (hibridização fluorescente *in situ*) - esta técnica utiliza sondas nucleotídicas fluorescentes que são complementares ao gene HER-2. Após a hibridação (ligação das sondas ao ADN complementar), as sondas podem ser visualizadas com um microscópio de fluorescência (Moelans et al., 2011). A identificação do número de cópias do gene HER-2 é realizada em conjunto com o número de cópias do centrómero do cromossoma 17 (CEP17) (Penault-Llorca et al., 2009). As vantagens deste método residem no facto de ter um sistema de *scoring* mais objetivo e quantitativo do que o da IHQ e de existir um controlo interno centromérico. As desvantagens referem-se ao maior custo associado a cada teste, maior demora na análise e necessidade de microscópio de fluorescência e de técnicos especializados (Ross et al., 2009).
- CISH (hibridização cromogénica *in situ*) - esta metodologia utiliza uma reacção de imunoperoxidase que permite a visualização das sondas HER-2, utilizando um microscópio de luz convencional (Moelans et al., 2011). Esta técnica combina as vantagens técnicas da IHQ com a reprodutibilidade da FISH (Ross et al., 2009). Existem dois tipos de teste CISH: um teste *standard*, que utiliza apenas uma sonda HER-2; e um teste bicolor que usa uma segunda sonda CEP17, que permite o cálculo do rácio HER-2/CEP17 e a exclusão da presença de polissomia do cromossoma 17 (Penault-Llorca et al., 2009).
- SISH (hibridização com prata *in situ*): esta técnica usa a peroxidase de rábano (HRP), que catalisa a redução do acetato de prata com produção de um sinal castanho/preto. Adicionalmente, possibilita a utilização de uma sonda complementar ao CEP17, que pode ser detetada numa lâmina sequencial (Moelans et al., 2011). As mesmas vantagens e desvantagens da CISH são reconhecidas a esta técnica.

De acordo com as mais recentes recomendações da ASCO (*American Society of Clinical Oncology* - Sociedade Americana de Oncologia Clínica) a avaliação da expressão do HER-2, tendo por base as técnicas de hibridização *in situ* (ISH), faz-se da seguinte forma: é calculado o rácio entre o HER-2 e a sonda que identifica o centrómero do cromossoma 17, sendo que numa segunda fase é avaliado o número de cópias do HER-2 por célula, de forma a obter o resultado final, tal como é explico em seguida (Wolff et al., 2013).

- Rácio HER-2/CEP17 <2,0:

- a) Número médio de cópias HER-2  $<4,0$  cópias/célula. Resultado negativo;
  - b) Número médio de cópias HER-2  $\geq 4,0$  e  $<6,0$  cópias/célula. Resultado equívoco. É necessário confirmação com novo teste;
  - c) Número médio de cópias HER-2  $\geq 6,0$  cópias/ célula. Resultado positivo.
- Rácio HER-2/CEP17  $\geq 2,0$ : Resultado positivo.

A título de curiosidade, um estudo de Salido et al. (2014), levado a cabo com o objetivo de comparar os critérios para os testes de ISH acordados na *update* da ASCO (2013) com os previamente definidos em 2007, concluiu o seguinte: o uso dos critérios recentemente definidos aumentou o número de resultados inconclusivos (11% *versus* 4,8%) e o número de casos positivos (23,4% *versus* 20%). Este estudo incluiu amostras de 430 TM's analisados entre janeiro de 2013 e fevereiro de 2014.

- MPLA (*multiplex ligation-dependent probe amplification* – amplificação “multiplex” de sondas dependentes da ligação): é baseada na técnica de PCR e requer quantidades muito pequenas de ADN isolado de material parafinado. Este método utiliza múltiplas sondas (até 45) dirigidas contra genes alvo e genes controlo em cada ciclo de PCR. Após a hibridização com as sequências alvo, pode ocorrer amplificação das sondas (Moelans et al., 2011; Sapino, Goia, Recupero & Marchiò, 2013). Esta técnica poderá ser alternativa ou complementar às técnicas de IHQ e ISH (Moelans et al., 2011).

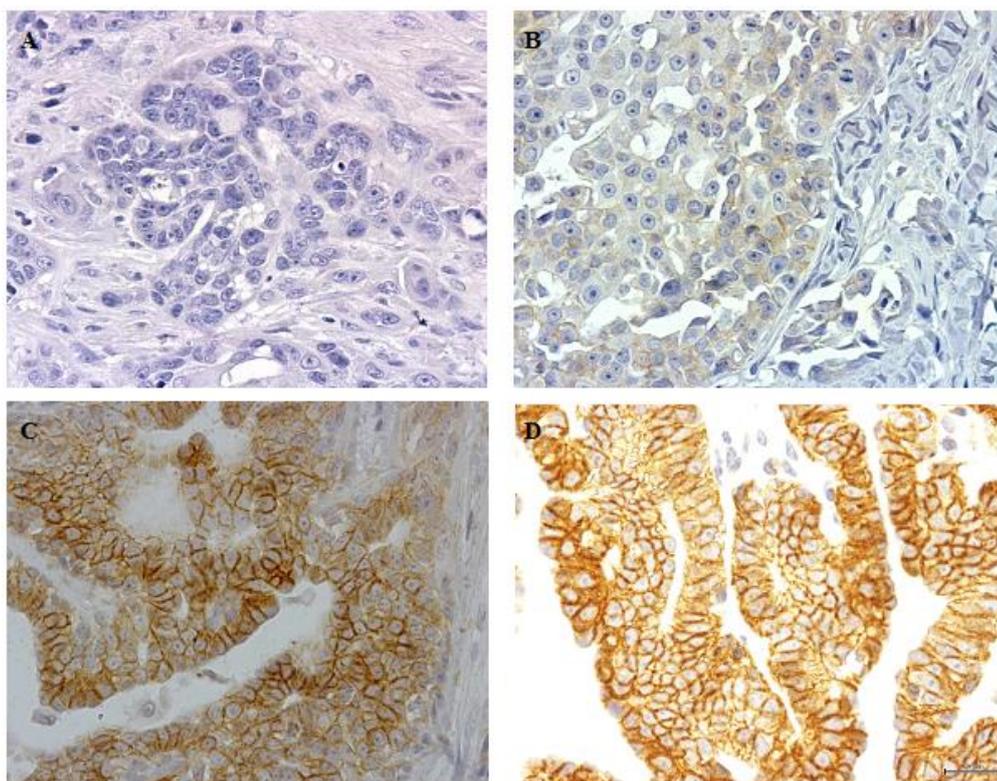
#### 4.5.2. Diagnóstico ao nível do ARN

- qRT-PCR: as dificuldades de isolamento do ARN a partir de material parafinado e a instabilidade deste material biológico comparativamente ao ADN limitam a utilização desta técnica (Moelans et al., 2011). Até à data, não existem estudos clínicos com robustez suficiente que permitam validar a capacidade deste método em prever a resposta às terapias anti-HER-2, apesar do interesse crescente do seu uso na quantificação dos níveis de mARN de HER-2, em pacientes com cancro mamário (Ross et al., 2009).
- *Microarray*: esta é uma técnica quantitativa que permite a avaliação simultânea de milhares de transcritos. Os seus custos relativamente baixos, em associação à grande disponibilidade de genes analisados, conduziram à disseminação do uso desta técnica e a avanços importantes na caracterização da biologia dos TM's (Fumagalli et al., 2014). O teste TargetPrint® baseia-se nesta tecnologia e permite a avaliação, ao nível do ARN, da sobre-expressão de RE, RP e HER-2 nos TM's (Moelans et al., 2011).

### 4.5.3. Diagnóstico ao nível da proteína

- Imuno-histoquímica (Figura 5): atualmente, esta técnica é a mais usada e padronizada para a determinação do *status* do HER-2. Este método de deteção do HER-2 é considerado simples, rápido, fácil e relativamente acessível (Moelans et al., 2011; Rhodes, Jasani, Anderson, Dodson & Balaton, 2002). Adicionalmente, a interpretação da expressão do HER-2 em biópsias *core* de TM é quase sempre representativa do tumor, mostrando boa correlação com as lumpectomias (Dabbs, 2006). As lâminas com as amostras de tecido são incubadas com um Ac primário anti-HER-2 e, depois, com um Ac secundário marcado. A proteína é visualizada através da adição de um cromogénio, o que resulta em marcação da membrana. Quanto maior a quantidade de HER-2 presente, mais intensa é essa marcação membranar (Moelans et al., 2011).

Figura 5 – Imagens de carcinomas mamários felinos, após IHQ para HER-2.



Legenda: A – TMF classificado como 0; B – TMF 1+; C – TMF 2+; D – TMF 3+. Imagens cedidas pela Dra. Maria João Soares, FMV – UL.

De acordo com as *guidelines* da ASCO, a análise da expressão do HER-2 faz-se do seguinte modo (Wolff et al., 2013):

- IHQ 0: resultado negativo. Não é observada marcação ou esta é muito incompleta e dificilmente perceptível;

- IHQ 1+: resultado negativo. Marcação incompleta da membrana e dificilmente perceptível em > 10% das células tumorais;
- IHQ 2+: resultado equívoco. Marcação membranar incompleta e/ou fraca/moderada, em > 10% das células tumorais; ou marcação da membrana completa, circunferencial e intensa, em < 10% das células tumorais. É necessária confirmação com teste FISH;
- IHQ 3+: resultado positivo. Marcação circunferencial da membrana completa e intensa em > 10% das células tumorais.

Por outro lado, esta metodologia acarreta algumas desvantagens, tais como a falta de estandardização da técnica devido à utilização de diferentes Ac anti-HER-2 (dirigidos contra epítomos do HER-2 extracelulares ou intracelulares); de diferentes protocolos de recuperação antigénica, de diferentes tempos até à fixação dos tecidos e duração deste passo (resultando na diminuição da sensibilidade e de falsos negativos); à deficiente seleção dos cortes histológicos; e a variabilidade interobservador na interpretação dos resultados (Owens, Horten & Da Silva, 2004; Zarbo & Hammond, 2003).

Estes aspetos relacionam-se com a necessidade de procedimentos de controlo de qualidade laboratorial no sentido da diminuição da variabilidade dos resultados, incluindo a análise periódica da percentagem dos casos positivos por IHQ e da concordância com a técnica de FISH (Dabbs, 2006; Paik et al., 2002). Esta variabilidade é mais crítica entre laboratórios locais e centrais, havendo uma concordância de apenas 74% entre os dois grupos (Roche et al., 2002).

Contudo, está descrita uma concordância de 92% e 94% entre as técnicas *gold standard* (IHQ e FISH), para os resultados obtidos em laboratórios centrais (Paik et al., 2002; Roche et al., 2002). A discordância existente deve-se, particularmente, à classificação dúbia de TM's (IHQ 2+), sendo que apenas 23% destes tumores apresentam amplificação do gene HER-2 (Dowsett et al., 2007; Owens et al., 2004).

O primeiro teste comercial para a determinação do *status* HER-2 a ser aprovado pela FDA foi o HercepTest® (DAKO) (Owens et al., 2004). Atualmente, outros *kits*, como o Pathway® (Ventana) e o Oracle® (Leica) são também recomendados (Sapino et al., 2013).

## 5. Sobre-expressão do HER-2 no TMC

Em Medicina Humana, como já foi referido, a expressão do HER-2 é usada como fator prognóstico e preditivo. Em cães, o papel da sobre-expressão do HER-2 nos TM's não foi ainda clarificado, tendo em conta que, apesar do número cada vez maior de estudos, os resultados apresentam grande variabilidade (Peña et al., 2014).

Os primeiros avanços neste campo evidenciaram o aumento da expressão do HER-2 a nível do mRNA (em 74% dos TMC's malignos), em contraste com a ausência do transcrito nos TMC's benignos (Ahern, Bird, Bird & Wolfe, 1996). Seguiram-se, então, várias publicações que determinaram a expressão do HER-2 nos TMC's, através da utilização da técnica de IHQ. Considerando os resultados daquelas publicações, as várias taxas obtidas de sobre-expressão de HER-2 são muito diferentes - os valores oscilam entre 9,8% e 48%, para os tumores malignos (Kurilj et al., 2011; Sassi, Benazzi, Castellani & Sarli, 2010). Em relação aos tumores benignos, a variação também é acentuada, com valores entre 17% e 50% (Kim et al., 2011; Rungsipipat et al., 1999).

Por conseguinte, a utilização de diferentes metodologias e sistemas de classificação e a variação da proporção de TMC's benignos e malignos são fatores que contribuem para justificar a variabilidade encontrada (Martín de las Mulas, Ordás, Millán, Fernández-Soria & Ramón y Cajal, 2003; Ressel et al., 2013).

Na Mulher, a relevância clínica do HER-2 está bem determinada, sendo que a amplificação e/ou sobre-expressão deste marcador molecular associa-se com uma maior agressividade dos TM's e, portanto, com pior prognóstico.

Na cadela, dois estudos evidenciaram uma associação dos TMC's HER-2+ com um melhor *outcome* clínico (Gama, Alves & Schmitt, 2008; Hsu, Huang, Liao, Wong & Chang, 2009), enquanto noutro não foi encontrada uma correlação entre o tempo de sobrevida e este subtipo tumoral (Ressel et al., 2013).

Por outro lado, determinados parâmetros tumorais indicadores de pior prognóstico mostram associação forte com os TMC's HER-2+, nomeadamente o tipo histológico carcinossarcoma (Gama et al., 2008), o grau de malignidade mais elevado (Dutra, Granja, Schmitt & Cassali, 2004), o elevado índice mitótico (Dutra et al., 2004; Ressel et al., 2013) e um marcado pleomorfismo nuclear (Dutra et al., 2004). Adicionalmente, no estudo de Martín de las Mulas et al. (2003), as cadelas com carcinomas mamários que mostraram sobre-expressão do HER-2, apresentaram doença metastática e morreram num período até 6 meses após a cirurgia. Os mesmos autores, através da técnica de CISH, verificaram a ausência de amplificação do gene HER-2 em carcinomas caninos classificados como positivos (*score* 3+) pela técnica de IHQ. Assim sendo, sugerem a utilização dos carcinomas mamários caninos como modelos naturais para o grupo de carcinomas humanos com sobre-expressão proteica do HER-2, mas sem amplificação deste gene.

No âmbito da oncologia comparada, Singer et al. (2012) compararam a homologia das sequências proteicas do HER-2 canino e do seu homólogo humano, com o intuito de investigar o potencial do recetor canino ser reconhecido pelos Ac anti-HER-2 humanizados.

Estes autores descobriram uma homologia de 92% entre as duas proteínas e, também, que o local de ligação do trastuzumab é igual em ambos os recetores, com a exceção de um Aa. As considerações apontadas apoiam a possibilidade do uso de imunoterapia baseada em Ac no tratamento do TMC HER-2+, assim como o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas com base na medicina comparada (Singer et al., 2012).

## **6. Fator sérico do HER-2 (sHER-2)**

Como referido anteriormente, não foi até à data identificado um ligando específico para o HER-2. Contudo, este recetor pode sofrer dimerização e possui forte atividade de TQ. A ligação de um ligando ao DEC induz um processo de dimerização e de ativação da quinase citoplasmática, o que resulta na autofosforilação do recetor e iniciação de vias de sinalização por ele controladas (Cho et al., 2003).

A descoberta da existência de um fragmento solúvel (DEC do HER-2, designado sHER-2) com cerca de 105-110 KDa foi, inicialmente, realizada em culturas de linhas celulares (SK-BR-3) de carcinomas mamários (Zabrecky, Lam, McKenzie & Carney, 1991). Subsequentemente, foi isolado em efusões pleurais e no soro de pacientes com TM em fase avançada (Leitzel et al., 1992), tendo sido já demonstrada também a sua presença no soro e no plasma de indivíduos saudáveis e com cancro de mama (Carney et al., 2003).

A importância conferida ao sHER-2 prende-se com o facto de este indicador ter vindo a ser sugerido como biomarcador para a determinação do *status* HER-2 em pacientes com TM (Kong et al., 2006; Lam et al., 2012; Lennon et al., 2009).

Adicionalmente, e tendo em conta a extensa revisão de Carney et al. (2003), poderá servir de biomarcador prognóstico devido à forte correlação encontrada entre níveis aumentados (acima de um *cutoff* definido) de sHER-2 e menor TTP (*time to progression*), OS e DFS.

Carney, Bernhardt e Jasani (2013), tendo por base diversas publicações, destacam que a diminuição ou aumento dos níveis de sHER-2 ocorre paralelamente ao curso clínico da doença. Finalmente, a combinação da quantificação dos níveis de sHER-2 com as técnicas de IHQ e FISH poderá resultar numa seleção mais correta dos pacientes que irão beneficiar do tratamento com trastuzumab, assim como potencializar a deteção precoce da recorrência da doença oncológica (Lam et al., 2012).

Numa revisão bibliográfica que englobou 67 estudos, Lam et al. (2012) referem uma percentagem média de 32% de pacientes com cancro mamário que mostram aumento dos níveis séricos de HER-2. Mais concretamente, estes autores apontam uma maior frequência de deteção deste biomarcador em pacientes com doença metastática (43%), em contraste com doentes com TMP (18%). Recentemente, uma revisão de Carney e colegas (2013) sumariou

os resultados de várias publicações datadas desde 2007, que usaram o teste ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) aprovado pela FDA para a detecção do sHER-2 (com um *cutoff* bem definido de  $\geq 15$  ng/ml). Com base nestes estudos, foi demonstrada uma prevalência de níveis elevados de sHER-2 ( $\geq 15$  ng/ml), em 10% a 15% dos pacientes com TMP, atingindo uma percentagem até 90% em pacientes com TMM HER-2+.

Em termos de comparação com as técnicas *gold standard* (IHQ e FISH), não existem publicações suficientes que tenham investigado a concordância entre os testes sanguíneos e as referidas técnicas (Tsé et al., 2012). Tsé et al. (2005) compararam as diferentes técnicas (IHQ, FISH e ELISA) em pacientes com doença metastática, tendo encontrado, para a técnica de ELISA, uma sensibilidade e especificidade de 90% e 83%, respetivamente, em relação à IHQ, e uma sensibilidade de 90% e especificidade de 77% em relação à FISH. Estes autores concluíram que a medição do HER-2 sérico constitui uma abordagem com elevada reprodutibilidade na determinação do *status* HER-2 em pacientes com cancro mamário metastático.

Contudo, apesar de já ter passado mais de uma década desde que o primeiro teste para a detecção do sHER-2 foi aprovado pela FDA, este método ainda não foi amplamente introduzido na prática clínica (Lam et al., 2012). Segundo estes autores, as discrepâncias encontradas entre os níveis sorológicos do HER-2 e os níveis detetados nos tecidos, representam um obstáculo à utilidade clínica do sHER-2 e remetem para causas de várias ordens, que serão nomeadas de seguida:

- Imperfeição na determinação da positividade para o HER-2 nos tecidos: Anteriormente à atualização mais recente (Wolff et al., 2013), as *guidelines* da ASCO indicavam que a positividade para o HER-2 era conferida aos TM's que apresentassem mais de 30% de células tumorais com marcação (3+) na IHQ ou um rácio HER-2/CEP17 com um valor superior a 2,2 (Wolff et al., 2007). Neste contexto, pacientes que não preenchessem estes requisitos eram considerados como tendo TM HER-2-, apesar da possibilidade destes tumores apresentarem um número suficiente de células positivas para o HER-2 que poderão originar TMM HER-2+ e que são identificados através da medição sérica de HER-2 (Lam et al., 2012).
- Heterogeneidade tumoral: tendo em conta a natureza tumoral heterogénea, e de forma semelhante ao referido no tópico anterior, tumores considerados HER-2- podem conter subpopulações celulares com níveis elevados de expressão de HER-2, que se libertam do TMP, dando origem a metástases com sobre-expressão de HER-2 (Carney et al., 2013). Também, existem evidências de que a origem e o tamanho tumoral possam ter influência nos níveis de sHER-2 (Lam et al., 2012). Segundo Pallud et al. (2005), a

concentração média de sHER-2 foi maior nos tumores mistos invasivos e intraductais do que nos tumores puros invasivos. Além do mais, foi encontrada uma maior proporção de tumores positivos para o sHER-2 ( $> 15$  ng/ml) no grupo dos comedocarcinomas, em comparação com outros tipos tumorais. Em relação ao tamanho tumoral, observaram-se níveis aumentados de sHER-2 apenas em tumores de tamanho superior a 28-30 mm.

- Evolução do *status* para o HER-2 e da natureza cinética dos níveis de sHER-2: O cancro é uma doença progressiva. E células positivas para o HER-2 no TMP podem possuir vantagens de crescimento, aumentando assim a sua percentagem no curso da doença tendo, como resultado, a alteração do *status* do tumor (Fehm et al., 1997; Lam et al., 2012). Por outro lado, Fehm, Gebauer e Jäger (2002) observaram uma diminuição da percentagem de pacientes com níveis elevados de sHER-2, após cirurgia. Estes autores também verificaram a ocorrência do aumento dos níveis de sHER-2 em vários pacientes após o diagnóstico de TMP ou TMM durante o tratamento adjuvante ou de primeira linha, sugerindo que alterações na expressão do HER-2 e no fenómeno de *shedding* podem ocorrer durante o curso da doença e refletir mudanças no padrão de crescimento do TM.
- Definição dos níveis de *cutoff*: Alguns valores de *cutoff* são arbitrariamente escolhidos, tendo em conta os níveis de sHER-2 dos indivíduos saudáveis do grupo controlo, enquanto outros estudos têm em conta os *cutoffs* recomendados pelo fabricante do teste (Lam et al., 2012).
- Interferência sérica: este fenómeno pode ser a causa da ocorrência de níveis elevados de sHER-2 em indivíduos saudáveis e pacientes com TM HER-2-. O aumento do *cutoff* resulta numa diminuição do impacto de *background noise* ou falsos positivos, resultando numa melhor correlação entre o *status* para o HER-2 e os níveis de sHER-2 (Lam et al., 2012; Sørensen et al., 2013).

Em jeito de conclusão, apesar da quantificação do HER-2 no soro não substituir a sua deteção nos tecidos pelas técnicas *gold standard* recomendadas pela ASCO, poderá representar uma opção válida por parecer aumentar a exatidão na determinação do *status* HER-2 em pacientes com cancro de mama, especialmente em fases avançadas da doença (Carney et al., 2013; Tsé et al., 2012).

### **6.1. Produção do sHER-2**

No que que respeita à formação do sHER-2, existem atualmente duas formas descritas. De forma semelhante a outros recetores transmembranares da família HER, o DEC do HER-2

sofre um processo de clivagem proteolítica. Este domínio é clivado na superfície das células mamárias cancerígenas e libertado no soro, no qual pode ser quantificado através da técnica de ELISA (Carney et al., 2013; Lennon et al., 2009). Adicionalmente, proteínas solúveis truncadas do HER-2 podem ser geradas por *alternative splicing* a partir do transcrito do HER-2 (Tsé et al, 2012).

De seguida, faz-se uma breve descrição dos fenómenos conducentes à formação de DEC solúvel (sHER-2):

- Clivagem/*shedding* do DEC: resulta na formação de sHER-2 e do fragmento intracelular oncogénico p95<sup>HER-2</sup> (Figura 6). O local de clivagem do HER-2 localiza-se na região justamembranar, na alanina 648 (Tsé et al., 2012). A libertação do DEC através de clivagem proteolítica faz parte do mecanismo no qual ocorre a formação e ativação de um fragmento N-terminal truncado (p95) com atividade de quinase (Christianson, Joni, Doherty, Yuzhang & Lin, 1998; Zabrecky et al., 1991). Este envia sinais para o crescimento e sobrevivência das células tumorais e é consideravelmente mais oncogénico do que o HER-2 na sua forma intacta (Segatto, King, Pierce, Di Fiore & Aaronson, 1988; Tsé et al., 2012).

O *shedding* do ectodomínio de proteínas transmembranares, nomeadamente os EGFR, tem sido atribuído a diferentes subtipos de famílias de metaloproteínases, incluindo as famílias ADAM (*A Disintegrin And Metalloproteases* - metaloproteínases e disintegrinas) e MMP (*Matrix Metalloproteases* - metaloproteínases da matriz) (Sanderson, Dempsey & Dunbar, 2006).

- ADAM: família de proteínas membranárias, com importantes funções na regulação do fenótipo celular, resultantes da sua ação a nível da adesão celular, migração, sinalização e processamento proteolítico de diversos ectodomínios de recetores de superfície, incluindo os recetores da família HER (Edwards, Handsley & Pennington, 2008).

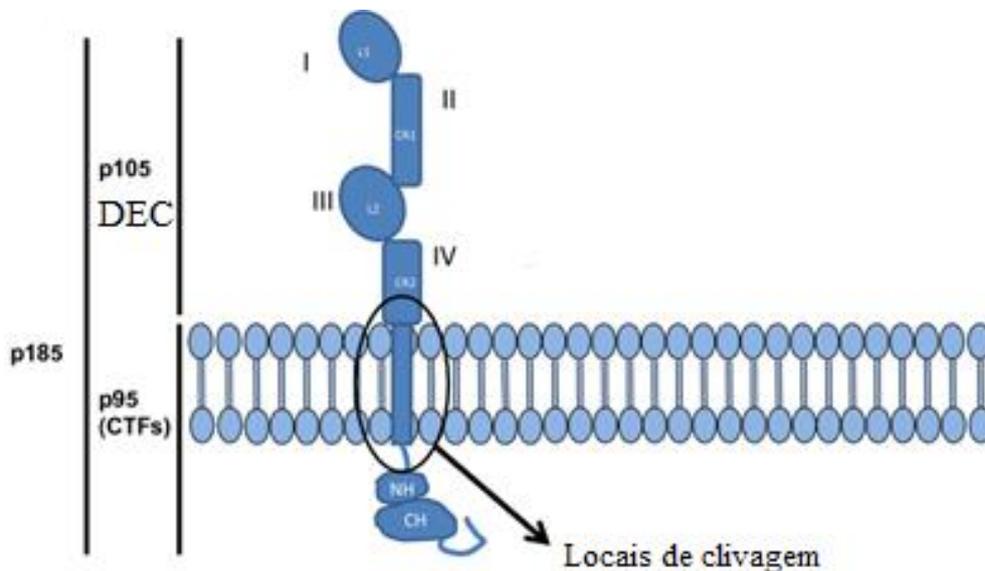
Diversas ADAM têm sido apontadas como tendo sobre-expressão no cancro de mama, nomeadamente as ADAM 10, 15 e 17 (Duffy, McKiernan, O'Donovan & McGowan, 2009; Tsé et al., 2012). De facto, foi demonstrada a libertação e ativação de vários ligandos de recetores da família HER envolvidos nos processos de formação e progressão tumoral, por parte das ADAM 10 e 17 (Duffy et al., 2009).

- MMP: família de endopeptidases dependentes de zinco, com capacidade para degradar vários componentes da matriz extracelular. Várias MMP têm sido implicadas em diferentes fases de progressão do cancro, tendo sido destacada a

sua ação promotora nos processos de invasão, metastização e angiogénese tumoral (Rundhaug, 2003; Sternlicht & Werb, 2001). Destas, destacam-se, em particular, as MMP 1, 2, 3, 9 e 14 (Sternlicht & Werb, 2001).

No que concerne à inibição destas metaloproteinasas, foi identificada uma família de proteínas com ação inibidora reversível, denominada TIMP (*Tissue Inhibitors of Metalloproteases* - inibidores tecidulares de metaloproteinasas) (Sternlicht & Werb, 2001). Como tal, têm sido realizados esforços no sentido de se desenvolverem inibidores que possam ser usados para impedir a progressão da doença oncológica, através da inibição destas enzimas (Rundhaug, 2003). Neste âmbito, foi demonstrada a inibição da atividade proteolítica responsável pelo processo de clivagem do DEC por um inibidor de MMP, o TIMP-1 (Codony-Servat, Albanell, Lopez-Talavera, Arribas & Baselga, 1999). Curiosamente, os níveis no soro deste inibidor foram significativamente maiores em pacientes com elevada concentração de sHER-2. Este achado foi explicado pelo facto de, em algumas circunstâncias, níveis elevados do TIMP-1 poderem ativar as ADAM 10, conduzindo assim ao *shedding* do HER-2 (Tsai et al., 2012).

Figura 6 – Representação esquemática do HER-2, com indicação dos sítios de clivagem do DEC (adaptado de Tsé et al., 2012).



- Processamento alternativo/*alternative splicing*: pelo menos duas formas truncadas do DEC podem ser originadas por *alternative splicing* do mARN do HER-2. Uma destas variantes de mARN codifica para uma proteína intracelular com 100 KDa, constituída pelos primeiros 633 Aa, a qual poderá estar associada ao desenvolvimento de

resistência aos Ac monoclonais dirigidos contra o HER-2 (Tsé et al., 2012). A segunda variante de *splicing* codifica uma proteína com 68 KDa, constituída pelos primeiros 340 Aa, que age como inibidor da proliferação celular, de forma semelhante ao Ac terapêutico pertuzumab (Aigner, 2001; Tsé et al., 2012).

## **6.2. Utilidade do sHER-2**

### **6.2.1. Indicador de prognóstico**

Existe uma forte correlação entre as concentrações elevadas de sHER-2 e pior prognóstico, devido a menor OS, menor TTP e menor DFS (Carney et al., 2003).

Vários estudos demonstraram pior OS em pacientes com níveis aumentados de sHER-2 (Bewick et al., 2001; Bramwell et al., 2008; Harris et al., 2001; Hayes et al., 2001; Imoto, Wada, Hasebe, Ochiai & Kitoh, 2006; Shao et al., 2014) e um melhor DFS em pacientes com níveis baixos de sHER-2 (Bewick et al., 2001; Shao et al., 2014).

Num estudo de Finn et al. (2009), que englobou 579 pacientes com TMM, a transição de níveis baixos para níveis aumentados de sHER-2 foi associada a um pior DFS, enquanto a mudança no sentido inverso foi associada a uma melhoria do mesmo indicador. Também, níveis consistentemente baixos de sHER-2 correlacionaram-se com um melhor DFS, do que níveis de sHER-2 constantemente elevados.

Continuando na mesma linha de raciocínio, de uma forma geral, níveis elevados de sHER-2 estão associados à mais rápida progressão da doença (Finn et al., 2009; Jensen, Johansen & Price, 2003; Sandri et al., 2007). De semelhante modo, nos pacientes em que ocorreu conversão de níveis <15 ng/ml para níveis superiores a este *cutoff* aquando da progressão da doença, a sobrevivência foi menor (Lipton et al., 2005). Em contraste, pacientes em que se verificou uma conversão de níveis > 15 ng/ml para níveis <15 ng/ml apresentaram melhor DFS (Shao et al., 2014).

Ainda a nível prognóstico, foi encontrada uma correlação positiva entre o sHER-2 e outros fatores, nomeadamente o elevado grau de malignidade, maior estágio, o envolvimento dos linfonodos (Imoto et al., 2006; Ludovini et al., 2008), o tamanho do tumor (Imoto et al., 2006) e a presença de metástases hepáticas (Jensen et al., 2003).

Apesar do grande número de publicações que ilustram a relevância da medição dos níveis de sHER-2, outros autores chegaram a conclusões contrárias no que respeita ao interesse clínico da quantificação deste biomarcador em pacientes com TM HER-2+ (Carney et al., 2013). De facto, a medição de sHER-2 para estabelecimento de prognóstico ainda não está recomendada pela ASCO (Harris et al., 2007).

### 6.2.2. Valor preditivo da resposta à terapêutica

Müller et al. (2004), num estudo em pacientes com TMM submetidos a epirrubicina e ciclofosfamida ou paclitaxel, não encontraram uma correlação entre os valores aumentados de sHER-2 medidos antes do tratamento e a resposta à quimioterapia.

No entanto, a análise estatística separada dos dois grupos revelou que os pacientes com valores aumentados de sHER-2, tratados com ciclofosfamida, demonstraram uma diminuição da resposta à terapêutica em comparação com pacientes sem níveis elevados. Por outro lado, pacientes com níveis elevados de sHER-2, submetidos a tratamento com paclitaxel, apresentaram um DFS significativamente mais favorável do que os pacientes tratados com o outro regime terapêutico. Mais recentemente, Mazouni et al. (2007) obtiveram resultados similares. Por seu turno, Colomer et al. (2004) correlacionaram os níveis elevados de sHER-2 antes da terapia hormonal e uma menor resposta ao tratamento instituído. Outros autores chegaram a conclusões semelhantes aumentando a incerteza sobre a utilidade da quantificação do sHER-2 (Classen et al., 2002; Leitzel et al., 1995; Mehta et al., 1998).

Em relação ao valor preditivo do sHER-2 no âmbito das terapias anti-HER-2, o quadro é inverso. Diversos estudos em pacientes submetidos a terapias com trastuzumab demonstraram uma resposta maior à terapêutica em mulheres com valores aumentados de sHER-2 (Kong et al., 2006; Kontani et al., 2013; Witzel et al., 2010). Não é inexpectável o facto de níveis elevados de sHER-2 predizerem a resposta a terapias com trastuzumab, tendo em conta que o recetor HER-2 contém o local de ligação deste Ac. Desta forma, o sHER-2 poderá servir como indicador da quantidade de recetores disponíveis para ligação, assim como da sua atividade no processo maligno (Carney et al., 2004).

Num estudo de Ali et al. (2008), a taxa de resposta foi de 57% para os pacientes tratados com trastuzumab que acabaram por apresentarem um declínio significativo ( $\geq 20\%$ ) dos níveis de sHER-2 em relação ao valor *baseline* (1ª medição realizada, correspondente ao valor medido antes da cirurgia ou aplicação da terapêutica), e de 28% para os pacientes que não apresentaram a mesma redução deste indicador. Adicionalmente, nos pacientes em que ocorreu este decréscimo, a duração da resposta foi maior.

Lipton e colegas (2011) investigaram a associação entre o valor *baseline* do sHER-2 e as mudanças da sua concentração com a ORR (*overall response rate*) em pacientes com TMM a receber monoterapia com lapatinib. Neste estudo, obteve-se uma associação positiva entre valores *baseline* aumentados de sHER-2 e a ORR. Adicionalmente, pacientes com um declínio de  $\geq 20\%$  em relação ao valor *baseline* apresentaram uma ORR significativamente maior em contraste com os pacientes com um aumento equivalente, os quais apresentaram uma ORR significativamente menor. Outros autores demonstraram resultados semelhantes no

que respeita à associação entre o grau de resposta ao tratamento com trastuzumab ou lapatinib e a ocorrência de uma diminuição igual ou superior a 20% dos níveis de sHER-2 (Witzel et al., 2010; Witzel et al., 2012). De facto, Lam et al. (2012) sugerem que as mudanças dos níveis de sHER-2 possam representar um biomarcador mais assertivo do que os próprios valores de *baseline*.

Finalmente, outros autores não obtiveram uma associação estatisticamente significativa entre os valores *baseline* de sHER-2 ou mudanças da sua concentração e a resposta à terapêutica, em pacientes com TMM submetidos a diferentes regimes de tratamento (quimioterapia e terapias anti-HER-2), não recomendando, por conseguinte, a tomada de decisões terapêuticas com base na medição dos níveis de sHER-2 (Lennon et al., 2009; Finn et al., 2009).

### **6.2.3. Papel do sHER-2 na monitorização da terapêutica**

De uma maneira geral, vários estudos revelaram que incrementos na concentração de sHER-2 refletem progressão da doença, enquanto a diminuição da concentração indica resposta à terapêutica ou ausência de doença progressiva (Carney et al., 2003). Mais concretamente, em relação à utilização de terapia hormonal ou de quimioterapia no tratamento de pacientes com TMM, mudanças na concentração sérica de HER-2 ocorrem paralelamente à evolução clínica, havendo vários estudos que demonstram uma correlação de 80% a 90% entre estas variáveis. No que respeita às terapias baseadas no trastuzumab, a conclusão é similar, havendo uma elevada correlação entre o curso clínico da doença e as mudanças nos níveis de sHER-2 (Carney et al., 2004).

### **6.2.4. Valor do sHER-2 no diagnóstico precoce de recidiva**

Vários estudos demonstraram que níveis elevados de sHER-2 antecedem o surgimento de sinais clínicos de recorrência do cancro mamário sendo, pois, um indicador precoce de progressão da doença (Carney et al., 2013).

Num estudo de Fehm e colegas (2002), níveis elevados de sHER-2 foram detetados em 27% e 50% dos pacientes, aos 6 meses e 3 meses, respetivamente, antes do diagnóstico clínico de metástases.

Por outro lado, Sørensen et al. (2009) observaram um aumento dos níveis de HER-2 no soro em pacientes com TM HER-2+, 3 a 24 meses antes da confirmação clínica de recorrência através de diagnóstico imagiológico. Posteriormente, Sørensen e colegas (2013) encontraram uma correlação estatisticamente significativa entre os níveis de sHER-2 medidos antes da deteção de metástases e o *outcome* clínico (doença metastática). De facto, baseando-se numa extensa revisão da literatura, Carney et al. (2004) indicam que concentrações aumentadas de

sHER-2 podem indicar recorrência 2 a 9 meses antes do aparecimento dos sinais clínicos ou do diagnóstico de recidiva.

### 6.3. Medição dos níveis de sHER-2

A quantificação do sHER-2 é principalmente realizada através de testes baseados na técnica de ELISA. Contudo, esta técnica apresenta algumas limitações, nomeadamente o facto das concentrações séricas normais (<15 ng/ml) serem muito próximas do limiar de positividade deste ensaio, favorecendo a ocorrência de *background noise* e de falsos positivos. Não obstante, trata-se uma técnica objetiva e acessível (Lam et al., 2012).

Hayashi et al. (2012) referem a existência de duas metodologias principais para a deteção do sHER-2: a técnica de EIA (*enzyme immunoassay*) e o método CLIA (*chemiluminescence immunoassay*). O primeiro método utiliza dois Ac monoclonais murinos anti-HER-2 (6G10 e SV-2-61), cada um reconhecendo um epítipo distinto do DEC do HER-2. O Ac de captura 6G10 é adsorvido numa placa, sendo posteriormente incubado com a amostra de soro numa *bead coated* de poliestireno, o que resulta na ligação do sHER-2 presente na amostra ao Ac adsorvido. Após as lavagens da *bead coated*, tem lugar uma segunda incubação com o anticorpo de deteção SV-2-61, conjugado a HRP, que se liga ao DEC capturado pelo primeiro Ac. Depois desta incubação o Ac de deteção não ligado é removido com as lavagens e é adicionado um substrato que reage com a HRP, produzindo um produto colorido. Finalmente, é determinada a absorvância (James et al., 2008; Sugano et al., 2000).

O método CLIA é um imunoensaio do tipo sanduíche que utiliza a tecnologia quimioluminométrica. Esta metodologia requer um Reagente Lite composto pelo Ac monoclonal TA-1, marcado com éster de acridínio. O Reagente Conjugado de Fluoresceína é composto pelo Ac monoclonal NB-3, marcado com fluoresceína. A Fase Sólida é composta pelo Ac de captura murino monoclonal purificado (antifluoresceína), ligado de forma covalente a partículas magnéticas, que liga o imunocomplexo. Deste modo, inicia-se a reação, sendo que o grau de quimioluminescência é diretamente proporcional à quantidade de Ag na amostra (Esteve et al., 2005).

Apesar do método de EIA ter sido caracterizado como útil na monitorização de recidivas (Sugano et al., 2000), estão descritas incompatibilidades ao nível dos Ac utilizados, caso as amostras de soro sejam provenientes de pacientes tratados com trastuzumab (Lam et al., 2012). Estas incompatibilidades devem-se ao facto dos dois Ac murinos monoclonais usados neste *kit* (6G10 e SV-2-61) competirem com os Ac terapêuticos que permanecem em circulação, subestimando, desta forma, a concentração de sHER-2 (Hayashi et al., 2012; Lam et al., 2012).

O problema acima exposto é ultrapassado pelo método CLIA, que utiliza dois Ac monoclonais (TA-1 e NB-3) que se ligam de forma específica a epítomos únicos do DEC do HER-2, diferentes dos reconhecidos pelo trastuzumab (Payne et al., 2000). Como tal, foi atribuída uma maior sensibilidade a este método na medição dos níveis séricos do HER-2 em pacientes submetidos a tratamento com trastuzumab, quando comparado com o método EIA (Hayashi et al., 2012).

O primeiro teste a utilizar este método mais sensível para medição do sHER-2 foi aprovado em 2000 pela FDA - Immuno-1<sup>®</sup>, Siemens HeathCare Diagnostics. Mais tarde, em 2003, foi também aprovado, com o mesmo propósito, o teste da Siemens HeathCare Diagnostics, ADVIA Centaur<sup>®</sup>. Ambos os testes são automáticos e têm um *cutoff* de 15ng/ml, valor acima do qual a concentração de sHER-2 é considerada aumentada (Tsé et al., 2012).

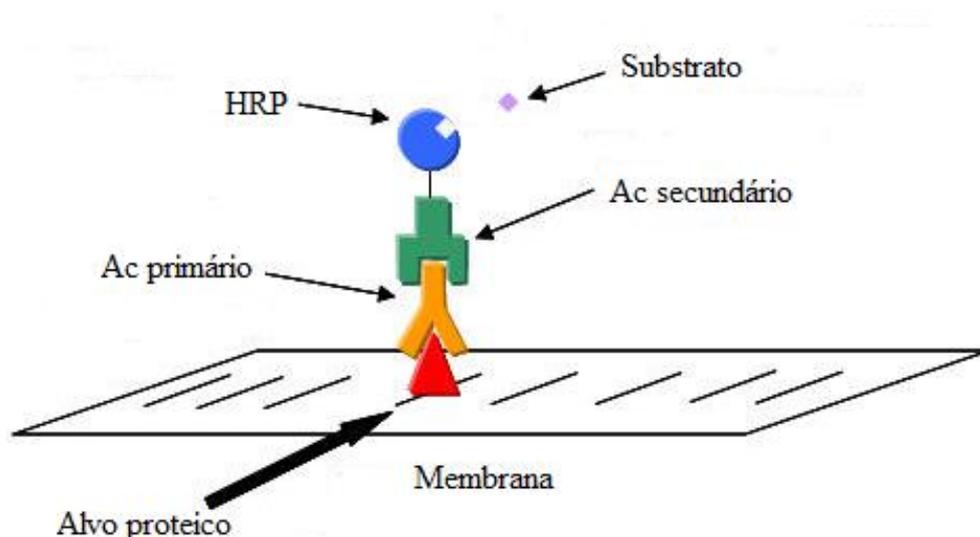
Por fim, o método *Dot Blot* (Figura 7), utilizado na deteção, análise e identificação de proteínas, foi descrito recentemente como mais um método passível de ser usado, sendo menos dispendioso. É sobre a aplicação deste método em cadelas com TM que versa o estudo experimental deste trabalho.

Em estudos de proteómica, este procedimento é utilizado como método qualitativo na rápida análise de um grande número de amostras para a presença de um Ag ou Ac, ou como técnica quantitativa para a determinação da concentração de um determinado Ag (Stott, 1989). Trata-se de um método semelhante à técnica de *Western Blot*, da qual difere por não ocorrer separação das proteínas da amostra por eletroforese (Abcam, 2015). Cada amostra de soro é depositada como um *spot* diretamente sobre uma membrana, que é posteriormente submetida a secagem. Para a adsorção à membrana de maiores quantidades de amostra pode ser usado um sistema de vácuo (Towbin & Gordon, 1984). Depois da secagem, a membrana sofre um processo designado bloqueio, adicionando-se, posteriormente, o Ac primário que se vai ligar especificamente ao epítomo do DEC do HER-2. É então adicionado o Ac secundário de deteção conjugado a HRP (anti-imunoglobulina específica para a espécie utilizada na produção do primeiro Ac). Por último, adiciona-se o ECL (*enhanced chemiluminescence*), um substrato que vai permitir a emissão de luz. Esta emissão luminosa resulta da oxidação do luminol num produto quimiluminescente, uma reação catalizada pela HRP. Os fotões emitidos são detetados através da exposição a uma película de Raios-X, na mesma proporção à quantidade de sHER-2 presente na amostra (Coelho, 2013; Stott, 1989).

Tan et al. (2011) publicaram o primeiro estudo onde é realizada a determinação dos valores de sHER-2 por *Dot Blot*, tendo detetado níveis elevados em 25% dos pacientes com carcinomas ductais não invasivos e em 35,2% dos casos com carcinomas ductais invasivos. Estes autores obtiveram uma correlação estatisticamente significativa entre os valores de sHER-2 medidos

através de *Dot Blot* e a determinação do *status* HER-2 por IHQ. Adicionalmente, relativamente à técnica de ELISA, foi calculada uma especificidade e sensibilidade de 95,3% e 65,0%, respetivamente. Foram também correlacionados níveis elevados de sHER-2 com negatividade para os RE e o grau III de malignidade. Por fim, os autores apontaram as seguintes vantagens a esta técnica: menor custo devido à menor quantidade de Ac e de amostra necessária (contrariamente à ELISA, não requer a inclusão de Ac pré-*coating*); apropriada para a testagem de um grande número de amostras; é de fácil e rápida execução. As desvantagens prendem-se com o facto de ser uma técnica pouco otimizada em termos dos sistemas de impressão, deteção e análise das amostras, o que implica alguma variabilidade e menor reprodutibilidade; por outro lado, a classificação dos *dots* está associada a algum grau de subjetividade, o que limita a especificidade e sensibilidade da técnica; por último, é uma técnica semiquantitativa (Abcam, 2015; Stott, 1989; Tan et al., 2011).

Figura 7 – Imagem representativa do método de *Dot Blot* (adaptado de The University of Arizona, 2006).



## II. Objetivos do trabalho experimental

- Detecção e quantificação dos níveis de sHER-2 em cadelas com cancro mamário, através da técnica de *Dot Blot*, utilizando para o efeito o anticorpo monoclonal SP3.
- Identificar a existência de diferenças significativas nas concentrações de sHER-2 em amostras de soros hemolisados e soros não hemolisados.
- Verificar se os níveis de sHER-2 são distintos entre a população de animais doentes e a população de animais saudáveis.
- Avaliar a concordância entre os doseamentos de sHER-2 realizados pelo método de *Dot Blot* e os resultados obtidos pela técnica de IHQ.
- Encontrar associações estatísticas entre a concentração de sHER-2 e os diferentes parâmetros clínico-patológicos (idade, raça, tamanho tumoral, TNM e presença de metástases nos linfonodos); classificação histopatológica e grau de malignidade.
- Identificar associações estatísticas entre os níveis de sHER-2 e os indicadores OS e DFS.

### **III. Material e Métodos**

#### **1. Amostragem**

##### **1.1. Seleção, recolha e processamento**

Neste estudo utilizaram-se amostras serológicas recolhidas em cadelas. A maioria dos animais selecionados realizaram alguma intervenção cirúrgica (mastectomia ou OVH) no Hospital da FMV-UL, tendo os restantes sido disponibilizados por clínicas veterinárias. Foram constituídos dois grupos de amostragem: um grupo de amostras recolhidas em cadelas com TM; e outro grupo de amostras recolhidas em pacientes saudáveis, que serviram de controlo negativo.

No total, foram analisados 38 soros de cadelas com TM e 28 soros de cadelas saudáveis. Em relação a estas últimas, a recolha de sangue foi realizada antes da cirurgia (com os pacientes sob a influência da anestesia), de forma a minimizar o *stress* inerente a este procedimento. Por animal, foram recolhidos 1-2 ml de sangue para tubos secos (sem anticoagulante), que foram colocados no frigorífico durante 2 a 6 horas. Posteriormente, os sangues foram sujeitos a uma centrifugação a 1000 rpm, durante cerca de 10 minutos, para se proceder à recolha do soro para alíquotas de 0,5 ml, que foram armazenadas a -80°C.

O acesso aos dados clínicos, nomeadamente, a idade, a raça e informações acerca dos TM's (tamanho, classificação histopatológica, grau de malignidade, envolvimento dos linfonodos e permeação vascular), foi realizado através da plataforma informática QVET, no caso dos pacientes do Hospital da FMV-UL. Nos restantes casos, a informação foi disponibilizada pela colega Angelina Pedrosa, que previamente recolheu várias amostras de TMC's no âmbito do seu trabalho experimental do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, tendo analisado os resultados da IHQ.

##### **1.2. Imuno-histoquímica**

A análise IHQ dos TMC's teve como objetivo a deteção da expressão do HER-2, sendo que os resultados foram utilizados neste estudo tendo em conta o facto de esta ser a técnica *gold standard* para a avaliação da expressão deste marcador.

A técnica de IHQ consistiu na desparafinação dos cortes através da colocação das lâminas em xilol, seguida da reidratação dos tecidos através da passagem por concentrações decrescentes de etanol (etanol a 100%, 95% e 70%). A recuperação antigénica realizou-se em panela de pressão com solução tampão citrato de pH 6 (durante 2 minutos e a uma pressão de 2 atmosferas), e o bloqueio de proteínas com uma solução própria de bloqueio de proteínas. Posteriormente, foi realizada a incubação com o Ac primário CB11 (Ac monoclonal de

ratinho que deteta uma região do DIC do HER-2), um bloqueio pós-primário e uma incubação com um Ac secundário adequado. Por fim, foi aplicado um cromogénio e o respetivo substrato para sinalizar a presença do HER-2, tendo-se efetuado a coloração com hematoxilina de Mayer e, por último, a desidratação dos tecidos e montagem.

Na classificação dos TMC's quanto ao *status* do HER-2, foram seguidos os critérios para IHQ da ASCO (2007), de acordo com os quais, os tumores devem ser classificados em 0, 1+, 2+ e 3+, com base na avaliação da intensidade, extensão e homogeneidade da marcação da membrana citoplasmática (Wolff et al., 2007). Neste contexto, segundo Pena et al. (2014) os critérios interpretativos para IHQ de HER-2 em TMC devem ser os seguintes:

- IHQ 0: Ausência de marcação da membrana citoplasmática das células tumorais;
- IHQ 1+: Marcação fraca e incompleta da membrana das células tumorais (qualquer percentagem);
- IHQ 2+: Marcação forte e completa da membrana até 30% das células tumorais ou marcação fraca a moderada, completa e heterogénea em > 10% das células tumorais;
- IHQ 3+: Marcação forte, completa e homogénea da membrana em > 30% das células tumorais.

De acordo com as *guidelines* propostas pela ASCO (2007), apenas os tumores mamários com um *score* 3+ devem ser considerados positivos.

A execução desta técnica, assim como a avaliação da expressão do HER-2 nos TMC's, foi efetuada para Dra. Maria João Soares e pela colega Angelina Pedrosa, que, gentilmente, cedeu a informação supracitada (Anexo 2).

### **1.3. Material utilizado**

O material utilizado no protocolo experimental é descrito de seguida:

- TBS (Tris buffered saline) é uma solução tampão isotónica não tóxica para as células, utilizada em algumas técnicas bioquímicas (ELISA, IHQ, *Western Blot* e *Dot Blot*) por simular as condições fisiológicas do organismo humano ou animal, ao manter o pH num intervalo de valores relativamente estreito.
- Tween 20: é um detergente não iónico que pode ser adicionado ao TBS e que é utilizado como agente emulsificador, de bloqueio e na pré-extração por remover proteínas de membrana.

Neste trabalho experimental foi utilizado TBS-T (TBS com Tween 20) a 0,05% nas soluções de bloqueio, na diluição dos Ac e nas lavagens.

- BSA (Bovine serum albumin): a albumina sérica bovina foi usada como agente de bloqueio, tendo sido utilizada numa concentração de 2,5% (diluição em TBS-T).
- Água miliQ: a qualidade da água tem grande importância na obtenção de bons resultados experimentais. A remoção de contaminantes iônicos e orgânicos através do sistema de purificação MiliQ Water Purification System<sup>®</sup> (sistema disponível no laboratório do CIISA) permitiu obter água ultra-pura adequada à preparação das várias soluções utilizadas neste trabalho laboratorial.
- Anticorpo primário: foi usado o Ac monoclonal de coelho SP3 (Zytomed, Berlim, Alemanha), que reconhece o DEC do HER-2. A utilização do Ac SP3 para a avaliação do *status* HER-2 em carcinomas mamários, através da técnica de IHQ, demonstrou elevada especificidade (99,1%) e moderada sensibilidade (52,3%) (Ricardo, Milanezi, Carvalho, Leitão & Schmitt, 2007). O *shedding* do DEC (local de ligação do SP3) pode ser a razão para a moderada sensibilidade encontrada, uma vez que a perda do epítipo extracelular resulta num elevado número de resultados falsos negativos (Ricardo et al., 2007). Já outro estudo, que considerou a FISH como a técnica de referência, a especificidade e sensibilidade do Ac SP3 foi de 100% e 80%, respetivamente (Nassar, Cohen & Siddiqui, 2009).

Tendo em conta que as amostras de soro que serviram de controlo positivo para este estudo foram provenientes de gatas com carcinomas mamários com sobre-expressão de HER-2, a testagem prévia do Ac SP3 nesta espécie e a verificação da sua especificidade para a proteína HER-2 da gata, através da técnica de *Western Blot*, constituiu um passo de grande importância e que foi anteriormente realizado pela Dra. Maria João Soares, no decorrer dos seus trabalhos de doutoramento na FMV-UL.

- Anticorpo secundário: foi usado um Ac secundário anti-coelho, acoplado a HRP (Jackson ImmunoResearch Lab., West Grove, USA).
- ECL: *kit* com elevada sensibilidade para a deteção quimioluminescente da HRP. A ausência de proteína nestes reagentes possibilita a minimização de *background* devido à redução de ligações não específicas (Pierce<sup>®</sup> ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific).
- Película de Raios-X: película especial para ensaios de *immunoblotting* baseados na deteção pelo ECL (Amersham Hyperfilm GE Healthcare, Tokyo, Japan).

### 1.3.1. Protocolo de *Dot Blot*

Como referido anteriormente, esta é uma técnica simples, rápida e barata que permite a deteção e a quantificação de proteínas. No âmbito do trabalho experimental deste estudo (Anexo 1), o protocolo realizado foi o seguinte:

1. Desenho a lápis de uma grelha sobre a membrana de transferência, para indicação dos locais de pipetagem das várias amostras de soro;
2. Descongelamento das amostras que foram posteriormente homogeneizadas e sujeitas a *spin down*, através da utilização de um vórtex e de uma centrífuga, respetivamente;
3. Pipetagem de 1 µl de cada amostra de soro para o respetivo local na membrana;
4. Secagem da membrana em estufa a 37°C, durante cerca de 1 hora;
5. Bloqueio da membrana através da sua incubação com uma solução de BSA a 25%, durante 40 a 60 minutos;
6. Incubação *overnight* (aproximadamente 16 horas), a 4°C, da membrana com o Ac primário SP3 (Zytomed, Berlim, Alemanha), anticorpo monoclonal de coelho que deteta o DEC do HER-2, a uma diluição de 1:1000;
7. Três lavagens da membrana com tampão TBS-T, cada uma com cerca de 10 minutos;
8. Incubação da membrana com um Ac secundário anti-coelho, conjugado a HRP, a diluição de 1:100.000;
9. Repetição do passo 7;
10. Incubação da membrana com ECL, durante 5 minutos;
11. Sobreposição da membrana a películas de Raios-X, usando diferentes tempos de exposição;
12. Comparação da intensidade de sinal das várias amostras testadas com os controlos positivos, de concentração já conhecida.

### 1.4. Cálculo da concentração de sHER-2

Para a estimativa dos níveis de sHER-2, as películas de Raios-X correspondentes a cada membrana (cada uma com várias amostras de soro e com os controlos positivos) foram digitalizadas com uma resolução de 100 ppp e processadas no *software* de análise de imagens ImageJ (Open Source Software, versão 1.48, National Institutes of Health, Bethesda, USA). O *background* de todas as membranas foi reduzido em 50 ou 25 pixéis e procedeu-se à inversão colorimétrica para possibilitar a deteção da pixelagem correspondente a cada *dot*. Após a obtenção dos valores das densidades de pixéis dos vários *dots*, as concentrações de sHER-2 foram calculadas com o auxílio do programa Microsoft Office Excel® 2013. Neste programa, e através do uso dos valores das densidades dos pixéis correspondentes às 5 amostras de soros

de gatas com concentrações conhecidas (5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 50 ng/ml e 75 ng/ml), foi possível a construção de uma curva de calibração para cada membrana, o que possibilitou extrapolar as concentrações de sHER-2 nas amostras sorológicas das cadelas selecionadas para este estudo.

Tendo em conta que todas as amostras foram testadas em mais do que uma membrana, as membranas com um valor de  $R^2$  Maior, foram as usadas.

### **1.5. Análise de resultados**

Na análise estatística dos resultados foi utilizado o programa Microsoft Office Excel® 2013 e o sistema operativo IBM SPSS Statistics 20.0 (IBM, Nova Iorque, EUA). Uma vez que não foram verificados os pressupostos de normalidade para a amostra, através dos testes de Shapiro-Wilk e de Kolmogorov-Smirnov, as associações entre os níveis de sHER-2 e as diversas variáveis analisadas foram determinadas recorrendo aos testes de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis. Adicionalmente, o teste de Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ) foi utilizado para testar as mesmas associações, tendo em conta que o valor de *cutoff* considerado foi de 15 ng/ml. A concordância entre os resultados do *Dot Blot* e os resultados da IHQ foi avaliada pelo teste de Kappa. Finalmente, o método de Kaplan-Meier foi utilizado para investigar a relação entre a sobre-expressão do HER-2 e a OS e DFS. A OS foi definida como o período de tempo (meses) decorrido desde a mastectomia até à morte natural do animal ou eutanásia devido à progressão da doença tumoral e o DFS como o período de tempo (meses) entre a mastectomia e a recidiva.

Em todos os testes foi considerado um nível de significância de 0,05.

## **IV. Resultados**

### **1. Caracterização da amostra populacional**

#### **1.1. Variáveis clínico-patológicas – idade e raça**

Em relação à distribuição etária das cadelas com TM que participaram no estudo, observou-se que a cadela mais jovem apresentava 7 anos de idade, enquanto a mais velha tinha a idade de 17 anos, sendo a média de idades de  $12,8 \pm 2,5$  anos (Gráfico 1).

Relativamente à raça, 48,6% da população apresentava raça indeterminada, com a maioria das raças encontradas a apresentar um único exemplar (Gráfico 2).

Gráfico 1 – Distribuição etária das cadelas com TM maligno.

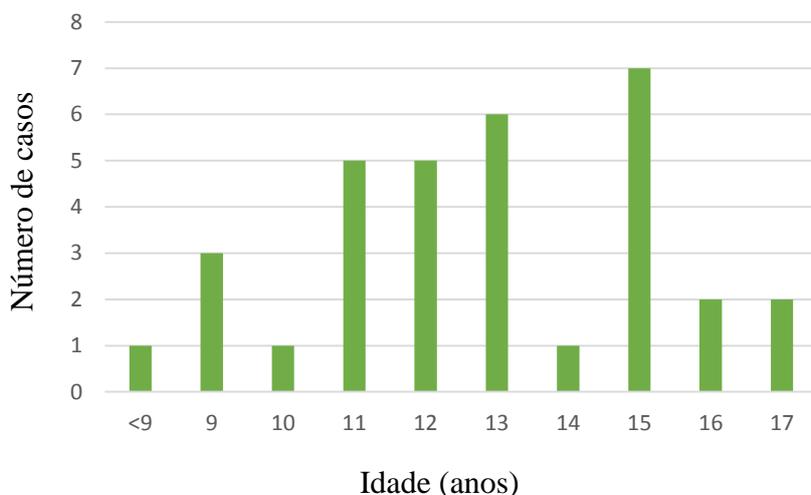
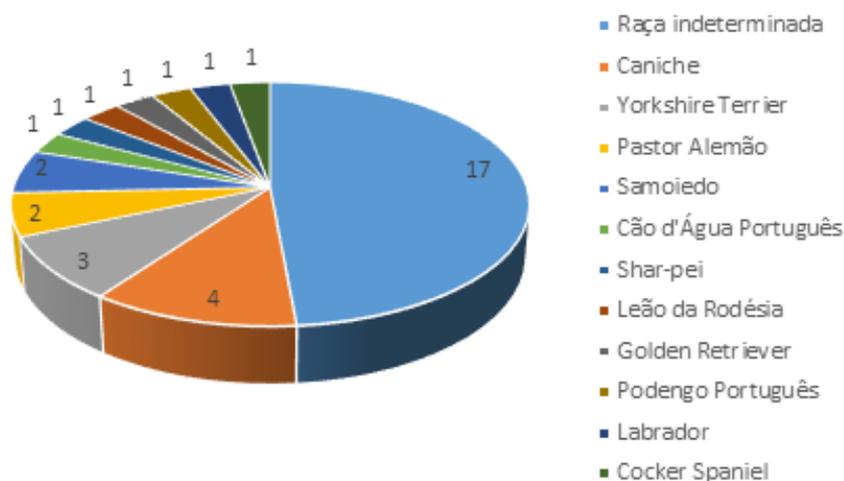


Gráfico 2 – Distribuição rácica das cadelas com TM maligno.



## 1.2. Caracterização da amostra de TMC's malignos

Foram avaliados 35 carcinomas mamários caninos, cujas características se encontram resumidas na Tabela 5. Relativamente aos tipos histológicos da população de tumores, destacam-se os carcinomas mamários complexos de tipo tubular e de tipo túbulo-papilífero, representando 54,3% (19/35) da amostra total. Além destes, também foram identificados 11 carcinomas simples de tipo tubular e de tipo túbulo-papilífero, 2 carcinomas de células escamosas, 1 carcinossarcoma, 1 carcinoma de tipo anaplásico e 1 carcinoma complexo (Tabela 5).

O grau de malignidade predominante foi o grau III (37,1%, 13/35 dos TMC's), seguido do grau I (34,3%, 12/35) e, por último, o grau II de malignidade (28,6%, 10/35).

Em termos de tamanho tumoral, 71,4% (25/35) dos tumores foram classificados como T1 (tamanho <3 cm), 17,1% (6/35) foram incluídos na categoria T2 (tamanho entre 3 e 5 cm) e 11,4% (4/35) na categoria T3 (tamanho > 5 cm). O tamanho médio dos TMC's, no seu eixo maior, foi de 2,72±3,1 cm, variando os tamanhos entre 0,3 e 18 cm (Anexo 3).

Em relação à presença de metástases nos linfonodos foi apenas identificado 1 caso, correspondente a uma cadela com um carcinoma mamário complexo de tipo túbulo-papilífero. Não foram identificados casos com permeação vascular.

Tabela 5 – Caracterização dos TMC's.

Característica	N (35)	%
<b>Classificação histológica</b>		
Carcinoma complexo tubular	10	28,6
Carcinoma complexo túbulo-papilífero	9	25,7
Carcinoma simples túbulo-papilífero	6	17,1
Carcinoma simples tubular	5	14,3
Carcinoma de células escamosas	2	5,7
Carcinossarcoma	1	2,9
Carcinoma anaplásico	1	2,9
Carcinoma complexo	1	2,9
<b>Grau de malignidade</b>		
Grau I	12	34,3
Grau II	10	28,6
Grau III	13	37,1
<b>Tamanho do tumor</b>		
T1 (< 3 cm)	25	71,4
T2 (3-5 cm)	6	17,1
T3 (> 5 cm)	4	11,4
<b>Metastização regional</b>		
Presente	1	2,9
Ausente	34	97,1
<b>Permeação vascular</b>		
Presente	0	0
Ausente	35	100

### 1.3. Quantificação do sHER-2

A quantificação dos níveis de HER-2 no soro das cadelas foi realizada através da comparação da intensidade do sinal de cada *dot* com o sinal dos *dots* das amostras de concentração conhecida usadas como controlos positivos (Figura 8).

Figura 8 – *Dot Blot* das amostras de sHER-2-felino de concentração conhecida.



Legenda: 1 – Concentração de sHER-2 de 5 ng/ml; 2 – 10 ng/ml; 3 – 20 ng/ml; 4 – 50 ng/ml; 5 – 75 ng/ml.

A intensidade de sinal dos vários *dots* foi traduzida por um valor calculado no programa ImageJ, correspondente à densidade de pixéis. Através dos valores obtidos para os controlos positivos construiu-se uma curva de calibração para cada membrana (Gráficos 3 e 4). A estimativa dos níveis de sHER-2 foi então calculada a partir das curvas de calibração selecionadas com base no valor de  $R^2$ . Tendo em conta que a unidade é o valor ideal de  $R^2$ , foram selecionadas duas membranas com valores de  $R^2$  de 0,9917 (Figura 9, M1) e de 0,883 (Figura 10, M2) para o estudo do grupo dos animais doentes. Na análise dos animais saudáveis foram usadas as mesmas membranas e uma membrana adicional (M3) com  $R^2 = 0,9148$ .

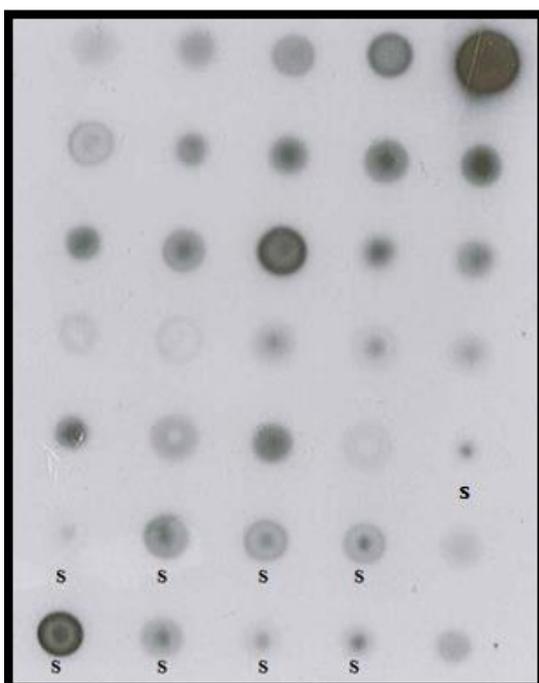


Figura 9 – Ensaio final de *Dot Blot* da membrana M1. A linha superior contém as 5 amostras correspondentes aos controlos positivos (da esquerda para a direita, as concentrações de sHER-2 são de 5, 10, 20, 50 e 75 ng/ml). Os *dots* marcados com um “S” correspondem a cadelas saudáveis sem TM. Os restantes *dots* representam amostras provenientes de cadelas com TM.

Gráfico 3 – Representação da curva de calibração com  $R^2 = 0,9917$ .

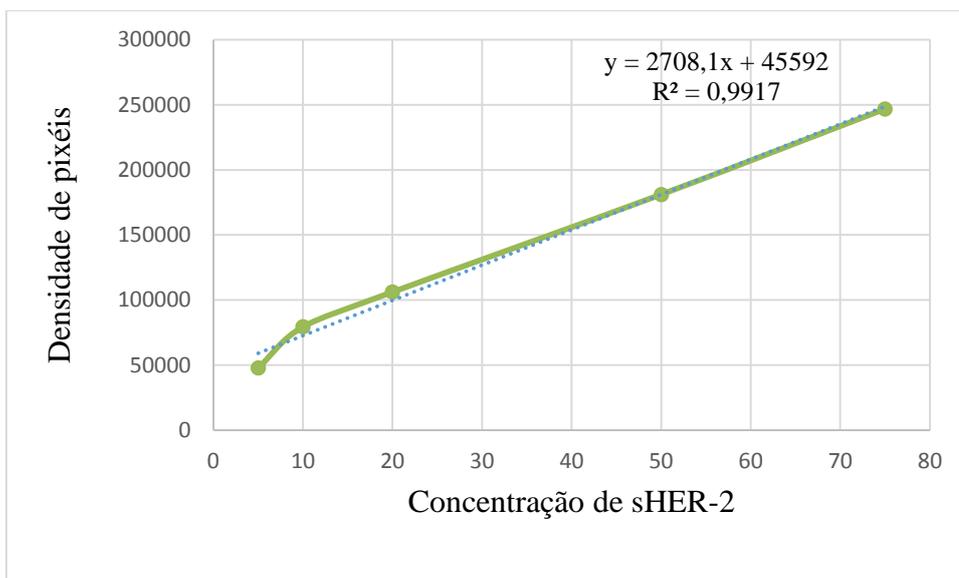
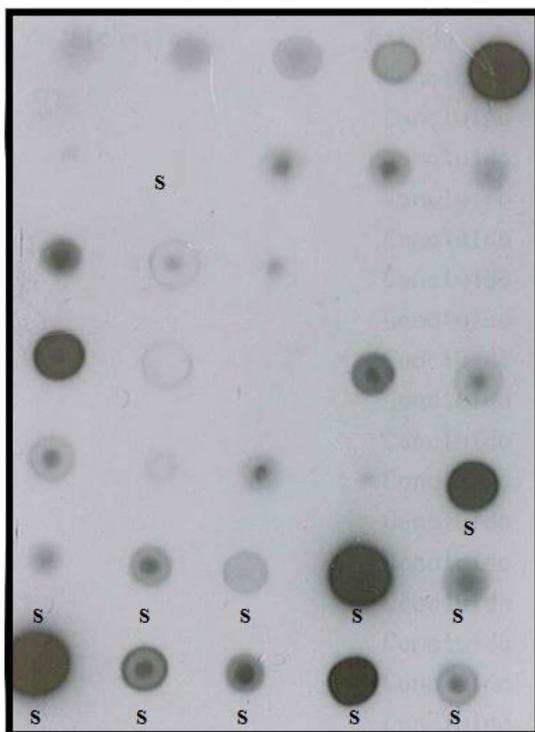
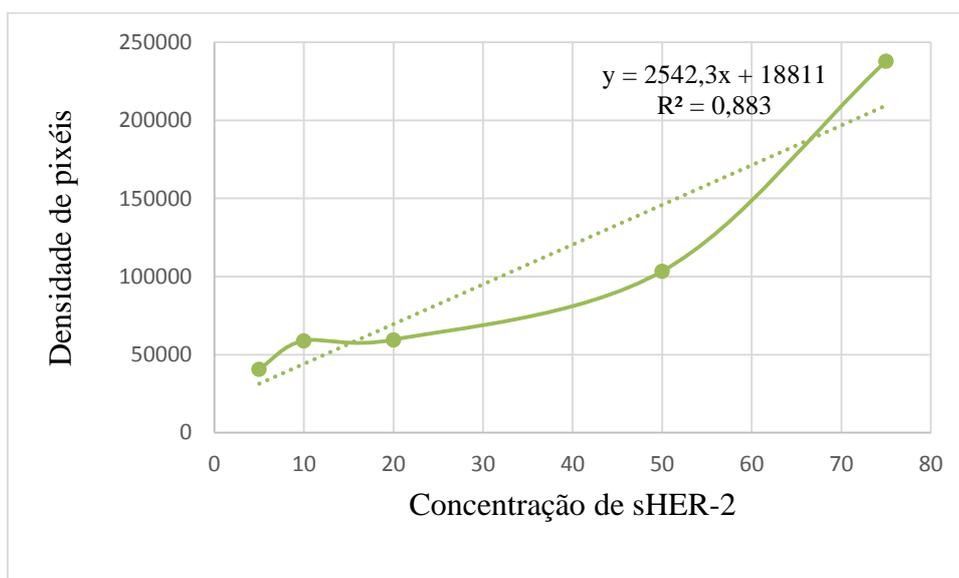


Figura 10 – Ensaio final de *Dot Blot* da membrana M2.



Legenda: A linha superior contém as 5 amostras correspondentes aos controlos positivos (da esquerda para a direita, as concentrações de sHER-2 são de 5, 10, 20, 50 e 75 ng/ml). S – *dots* correspondentes a cadelas saudáveis.

Gráfico 4 – Representação da curva de calibração com  $R^2 = 0,883$ .



### 1.3.1. Níveis de sHER-2 em cadelas com TM e em cadelas saudáveis

Relativamente às concentrações de sHER-2 nas cadelas doentes (N=35), estas variaram entre 0 ng/ml (casos 10 e 12) e 96,26 ng/ml (caso 28) (Tabela 6), apresentando um valor médio de 23,1 ng/ml.

Em relação aos animais saudáveis (controlos negativos), as concentrações de sHER-2 variaram entre 0 ng/ml e 115,22 ng/ml (caso 10) (Tabela 6), situando-se a média nos 31,1 ng/ml.

Tabela 6 – Concentrações de HER-2 sérico. Os valores entre parêntesis referem-se ao número do caso em estudo.

	Animais doentes		Animais saudáveis		
	M1 (R <sup>2</sup> = 0,9917)	M2 (R <sup>2</sup> = 0,883)	M1	M2	M3 (R <sup>2</sup> = 0,9148)
sHER-2 (ng/ml)	40,55 (3)	8,07 (1)	98,28 (1)	20,35 (18)	2,27 (14)
	12,12 (4)	0,67 (2)	13,49 (2)	0,00 (20)	0,00 (15)
	31,21 (5)	51,02 (8)	36,09 (3)	18,32 (21)	0,00 (17)
	3,34 (6)	0,63 (11)	17,59 (4)	0,00 (22)	0,00 (19)
	3,08 (7)	1,09 (17)	89,17 (5)	37,43 (23)	0,00 (28)
	7,11 (9)	63,84 (18)	41,47 (6)	90,16 (24)	
	0,00 (10)	27,66 (19)	82,70 (7)	19,44 (25)	
	0,00 (12)	2,03 (22)	66,68 (8)	0,00 (26)	
	22,74 (13)	96,26 (28)	56,63 (9)	6,41 (27)	
	1,60 (14)	1,98 (29)	115,22 (10)		
	21,90 (15)	17,47 (30)	33,58 (11)		
	74,69 (16)	28,47 (31)	21,98 (12)		
	31,57 (20)	16,23 (32)	4,22 (13)		
	29,08 (21)	9,77 (33)	0,00 (16)		
	55,59 (23)	5,72 (34)			
	45,14 (24)				
	33,58 (25)				
	40,91 (26)				
	16,96 (27)				
	9,06 (35)				

### 1.3.2. Exclusão dos soros hemolisados

Tendo em conta que os soros com hemólise podem resultar em falsos positivos, procedeu-se à avaliação visual de todas as amostras, no sentido de as classificar quanto ao seu grau de hemólise. Assim, os soros foram classificados como “soro não hemolisado” (Figura 11) ou como “soro hemolisado” (Figura 12).

Figura 11 – Soro não hemolisado



Figura 12 – Soro hemolisado



Após esta avaliação, procurou-se identificar a existência de diferenças significativas entre as concentrações de sHER-2 nos soros hemolisados e as concentrações dos soros não hemolisados, concluindo-se que existiam diferenças significativas ( $p\text{-value} = 0,0001$ ). Assim sendo, foram excluídos os soros hemolisados para que estes não interferissem nos resultados das associações estatísticas em estudo neste trabalho experimental. Foram então excluídos 10 soros do grupo das cadelas doentes, sendo a amostra final constituída por 25 indivíduos. No grupo dos animais saudáveis foram excluídos 9 soros com hemólise, perfazendo uma amostra final de 19 controlos negativos.

#### **1.4. Caracterização da população de cadelas saudáveis e de cadelas doentes quanto ao status HER-2 no soro**

De forma a cumprir o terceiro objetivo proposto, investigou-se a ocorrência de diferenças significativas entre as concentrações de sHER-2 da população de cadelas doentes e os valores obtidos para o grupo dos animais saudáveis.

Considerando a exclusão de todos os indivíduos cujos soros foram considerados hemolisados, a percentagem de animais doentes com níveis de sHER-2 acima de 15ng/ml (*cutoff* determinado para a Mulher) foi de 60% e de 42,1% no grupo controlo. Adicionalmente, a média das concentrações de sHER-2 nos animais doentes e nos animais saudáveis foi de 21,3ng/ml e de 18,4ng/ml, respetivamente (Anexo 3).

Em relação às diferenças nas concentrações de sHER-2, o  $p\text{-value}$  obtido foi de 0,849 não existindo, portanto, diferenças estatisticamente significativas dos níveis de HER-2 sérico entre as duas populações de animais consideradas.

## 2. Concordância entre a técnica de Imuno-histoquímica e o *Dot Blot*

De forma a investigar se a concordância entre os valores de sHER-2 obtidos no *Dot Blot* e os resultados obtidos na IHQ (Tabela 7) era estatisticamente significativa, optou-se por duas abordagens distintas.

Na primeira, analisou-se a correlação dos vários *scores* existentes para a IHQ (0, 1+, 2+ e 3+) com os valores obtidos no *Dot Blot*, sendo que não foi encontrado um resultado estatisticamente significativo ( $p\text{-value} = 0,411$ ). Na segunda abordagem agruparam-se os resultados da IHQ em dois grupos: um grupo referente aos resultados negativos (casos com *score* 0, 1+ e 2+) e um grupo referente aos resultados positivos (casos com *score* 3+). Também nesta análise não foi encontrada uma correlação estatisticamente significativa entre as duas técnicas consideradas ( $p\text{-value} = 0,656$ ).

Em ambas as abordagens foi usado como *cutoff* de positividade para o HER-2 sérico o 15ng/ml, de forma a dividir a população em animais com níveis aumentados ou diminuídos de sHER-2.

Como já foi referido, o teste utilizado nesta análise foi o teste de Kappa.

Tabela 7 – Avaliação da expressão do HER-2 nos TMC's – resultados da IHQ e *Dot Blot*.

sHER-2	HER-2 IHQ (classes)				Total
	0	1+	2+	3+	
<15 ng/ml	2	4	2	2	10
>15 ng/ml	–	10	3	2	15

## 3. Correlação estatística dos níveis de sHER-2 e as variáveis clínico-patológicas

A associação estatística das variáveis clínico-patológicas em estudo com os níveis de sHER-2 obtidos para a população de cadelas com TM foi avaliada e os resultados são apresentados na Tabela 8. Adicionalmente, as mesmas associações foram analisadas, admitindo-se o *cutoff* de 15 ng/ml, sendo que neste caso o teste utilizado foi o teste de  $\chi^2$  (Tabela 8).

Na análise da associação dos níveis de sHER-2 com a idade, os animais foram divididos em duas classes: idade > 9 anos e idade  $\leq$  9 anos.

Tabela 8 – Associação estatística entre os níveis de sHER-2 e as variáveis clínico-patológicas em estudo.

Variável	<i>p-value</i> Sem <i>cutoff</i>	<i>p-value</i> Com <i>cutoff</i> de 15 ng/ml
<b>Idade</b>		
Anos	0,912	0,808
> 9 anos / ≤ 9 anos	0,680	0,550
<b>Raça</b>		
Várias raças	0,440	0,367
Raça pura vs indeterminada	0,402	0,449
<b>Classificação histológica</b>	0,450	0,683
<b>Grau de malignidade</b>	0,162	0,978
<b>Tamanho do tumor</b>		
Classes (T1, T2 e T3)	<b>0,036</b>	0,121
Mm	<b>0,032</b>	0,071
<b>TNM (I, II, III e IV)</b>	0,036	0,121
<b>Metastização regional</b>	–	–

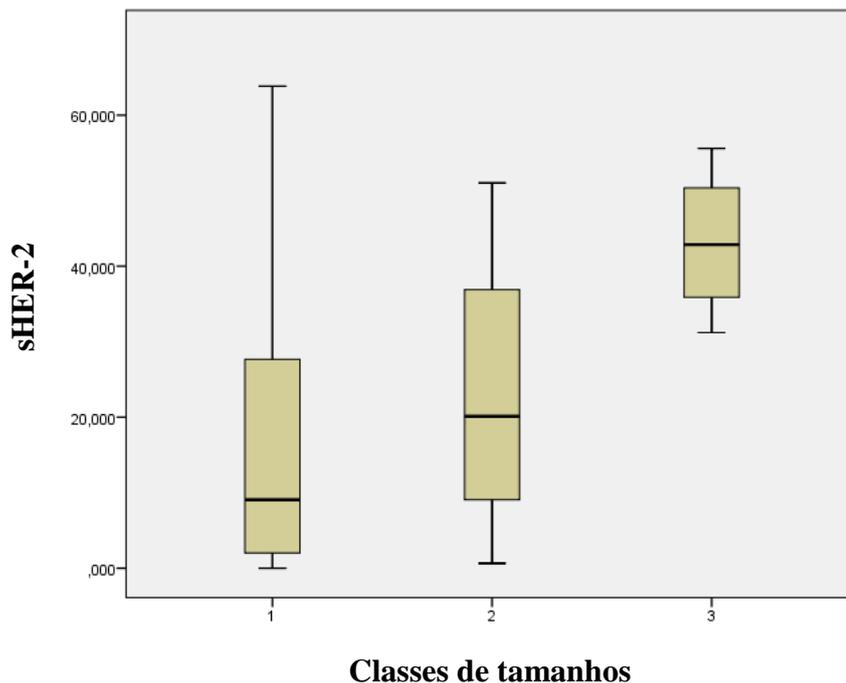
De acordo com a tabela 8, verifica-se a ocorrência de uma associação estatisticamente significativa entre os níveis de sHER-2 e o tamanho tumoral. Esta associação foi encontrada para ambas as abordagens de análise adotadas – tamanho dividido por classes (*p-value* = 0,036) e tamanho expresso em mm (*p-value* = 0,032). Assim, foi possível associar o maior tamanho tumoral com a maior concentração de sHER-2 (Gráfico 5).

Relativamente à classificação TNM, o valor de *p-value* encontrado foi igual ao encontrado para o tamanho tumoral (*p-value* = 0,036), uma vez que apenas um caso foi classificado como estágio IV. Assim sendo, a significância estatística desta associação não foi considerada.

Também, tendo em conta que se registou apenas um caso de envolvimento dos linfonodos, não foi possível calcular uma associação estatística referente à metastização regional.

Não se observou nenhuma associação estatisticamente significativa com as restantes variáveis clínico-patológicas analisadas, incluindo a análise na qual se considerou um *cutoff* de 15 ng/ml.

Gráfico 5 – Diagrama de extremos e quartis, representativo da associação entre o tamanho tumoral (classes T1, T2 e T3) e a concentração de sHER-2.



#### 4. Associação entre os níveis de sHER-2 com a OS e DFS

Relativamente à análise da OS e DFS das cadelas selecionadas para este estudo, foi possível recolher informações acerca do estado de saúde atual dos animais e da ocorrência de recidiva (através do contacto telefónico com os donos ou do acesso às fichas clínicas dos animais), em 20 dos 25 casos em estudo.

Quanto à OS, 5 animais morreram desde a mastectomia (cirurgias iniciaram-se no ano de 2013), sendo que as restantes 15 cadelas sobreviveram até ao momento da colheita dos dados (Tabela 9). Em relação ao DFS, 9 cadelas apresentaram recidiva dos TM's malignos (Tabela 10).

De forma a facilitar o tratamento estatístico dos resultados e a sua apresentação gráfica, procedeu-se à divisão dos dados de acordo com o *cutoff* de 15 ng/ml (Gráficos 6 e 7).

Tabela 9 – Relação entre os níveis de sHER-2 e a OS das cadelas com TM maligno.

Casos	sHER-2 (> ou = a 15 ou < 15 ng/ml)	OS (meses após a mastectomia)	Status
27	> ou = a 15	2	Morto
24	> ou = a 15	5	Morto
8	> ou = a 15	17	Morto
31	> ou = a 15	17	Vivo
32	> ou = a 15	17	Vivo
25	> ou = a 15	19	Vivo
23	> ou = a 15	19	Vivo
18	> ou = a 15	20	Vivo
13	> ou = a 15	21	Vivo
15	> ou = a 15	21	Vivo
5	> ou = a 15	23	Vivo
21	> ou = a 15	23	Vivo
11	< 15	12	Morto
2	< 15	16	Morto
34	< 15	16	Vivo
35	< 15	16	Vivo
12	< 15	21	Vivo
14	< 15	21	Vivo
9	< 15	22	Vivo
7	< 15	26	Vivo

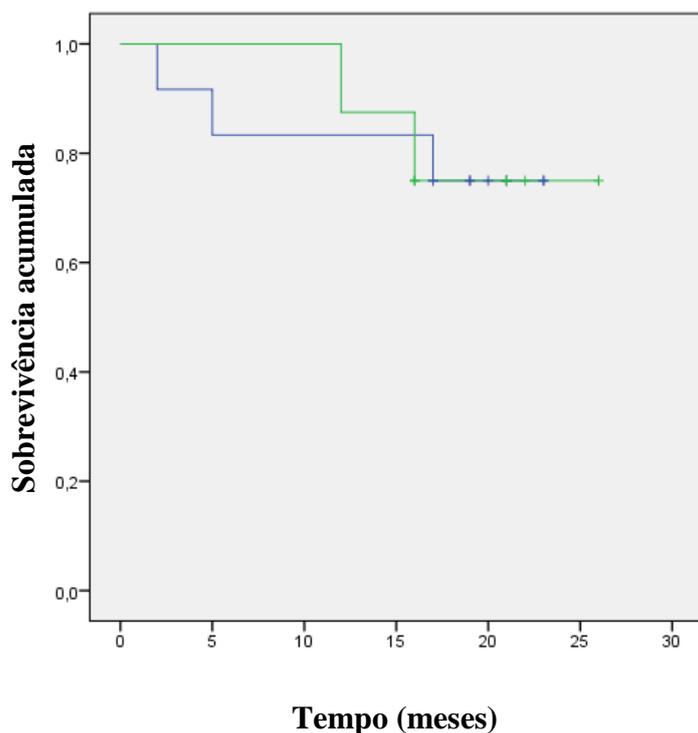


Gráfico 6 – Sobrevivência total (OS) das cadelas com TM maligno. — casos com sHER-2  $\geq$  a 15 ng/ml que faleceram; — casos com sHER-2 < a 15 ng/ml que faleceram; + cadelas com sHER-2  $\geq$  a 15 ng/ml que permaneceram vivas; + cadelas com sHER-2 < a 15 ng/ml que permaneceram vivas.

Ocorreram 3 mortes no grupo de animais com níveis aumentados de sHER-2 e 2 no grupo com níveis de sHER-2 <15 ng/ml. No primeiro ano após a cirurgia morreram 2 cadelas (16,6%) com níveis de sHER-2  $\geq$  a 15 ng/ml e 1 cadela (12,5%) sem aumento dos níveis de sHER-2. Não foi possível inferir acerca de uma correlação entre o sHER-2 e a OS ( $p$ -value = 0,973) (Gráfico 6) apesar de, aparentemente, o grupo sem aumento do biomarcador apresentar melhor prognóstico.

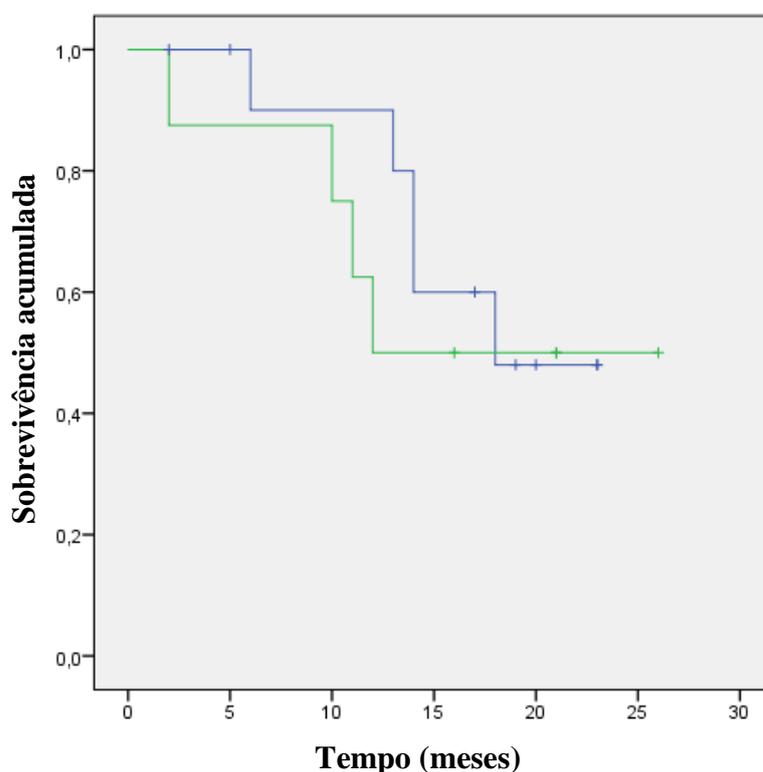
Relativamente ao DFS, a percentagem total de animais que apresentaram recidiva foi de 45% (9/20). No grupo com níveis aumentados de sHER-2 registaram-se recidivas em 41,6% (5/12) dos animais, enquanto no grupo de cadelas com níveis de sHER-2 abaixo de 15 ng/ml a percentagem de recidivas foi de 50% (4/8).

À semelhança da OS, não foi encontrada uma associação estatisticamente significativa ( $p$ -value = 0,653) entre níveis aumentados de sHER-2 e a ocorrência de recidiva (Gráfico 7).

Tabela 10 – Relação entre os níveis de sHER-2 e o DFS das cadelas com TM maligno.

<b>Casos</b>	<b>sHER-2 (&gt; ou = a 15 ou &lt; 15 ng/ml)</b>	<b>DFS (meses após a mastectomia)</b>	<b>Status</b>
27	> ou = a 15	2	Sem recidiva
24	> ou = a 15	5	Sem recidiva
15	> ou = a 15	6	Recidiva
23	> ou = a 15	13	Recidiva
8	> ou = a 15	14	Recidiva
32	> ou = a 15	14	Recidiva
31	> ou = a 15	17	Sem recidiva
13	> ou = a 15	18	Recidiva
25	> ou = a 15	19	Sem recidiva
18	> ou = a 15	20	Sem recidiva
5	> ou = a 15	23	Sem recidiva
21	> ou = a 15	23	Sem recidiva
34	< 15	2	Recidiva
2	< 15	10	Recidiva
11	< 15	11	Recidiva
9	< 15	12	Recidiva
35	< 15	16	Sem recidiva
12	< 15	21	Sem recidiva
14	< 15	21	Sem recidiva
7	< 15	26	Sem recidiva

Gráfico 7 – Intervalo livre de doença (DFS) das cadelas com TM maligno.



Legenda: —□ casos com sHER-2 ≥ a 15 ng/ml que apresentaram recidiva ; —□ casos com sHER-2 < a 15 ng/ml que apresentaram recidiva; +□ casos com sHER-2 ≥ a 15 ng/ml que não apresentaram recidiva ; +□ casos com sHER-2 < a 15 ng/ml que não apresentaram recidiva.

## V. Discussão

Este trabalho experimental teve como principal objetivo a detecção e quantificação do HER-2 no soro de cadelas com TM's malignos, através do método de *Dot Blot*. É de salientar a componente pioneira deste trabalho uma vez que não foi, até à data, descrito nenhum outro estudo que tenha desenvolvido esta técnica para a quantificação do sHER-2 na espécie canina. Dada a extrema importância deste biomarcador tumoral (sHER-2) no manejo dos TM's HER-2+ na Mulher, perspetivou-se analisar o papel potencial deste recetor nos TMC's, no sentido de se aprofundar o conhecimento acerca da relevância clínica do sHER-2 em cadelas com TM's malignos e, eventualmente, contribuir para a fundamentação de novas abordagens terapêuticas no que respeita aos TMC's HER-2+.

Neste âmbito, foi avaliada a concordância entre os níveis de sHER-2 obtidos no *Dot Blot* e os resultados da IHQ, uma vez que esta é a técnica *gold standard* para a determinação da expressão do HER-2 nos TM's (Pena et al., 2014).

No contexto da avaliação do cenário epidemiológico dos TMC's foram recolhidos vários dados clínicos e histopatológicos relativos a cada animal em estudo. Na população analisada, a idade média de ocorrência dos TM's foi de  $12,8 \pm 2,5$  anos, situando-se ligeiramente acima

do descrito na literatura (idade média entre os 10 e os 11 anos de idade) (Lana, Rutteman & Withrow, 2007). A ausência, na amostra em estudo, de cadelas com idade inferior a 7 anos é concordante com a literatura, uma vez que os TMC's raramente ocorrem em cadelas com menos de 5 anos (MacEwen & Withrow, 1996). Finalmente, no nosso país, grande parte das cadelas é de raça indeterminada (Peleteiro, 1994), o que vai ao encontro da percentagem de 48,6% de cadelas sem raça definida com TM.

No que concerne à relevância clínica da presença de HER-2 no soro de cadelas com carcinomas, analisou-se a percentagem de casos com valores aumentados de sHER-2 na população de animais doentes e no grupo controlo. Relativamente à quantificação do sHER-2, a presença de diferenças significativas ( $p\text{-value} = 0,0001$ ) entre as concentrações de sHER-2 nos soros com hemólise e nos soros sem hemólise, condicionou a inclusão dos soros hemolisados neste estudo (a presença de hemólise intensifica o sinal de cada *dot*).

Posteriormente, obtiveram-se níveis elevados de sHER-2 em 60% das cadelas com carcinomas (considerando o *cutoff* de 15 ng/ml aceite para a Mulher). Esta prevalência é muito superior à descrita na literatura, uma vez que, na espécie humana, apenas 15% dos pacientes com TMP apresentam níveis aumentados de HER no soro (Carney, Bernhardt & Jasani, 2013). Contudo, dada a grande variabilidade da sobre-expressão do HER-2 nos TMC's - há autores que referem percentagens de 9,8% a 48% nos TMC's malignos HER-2+ (Kurilj et al., 2011; Sassi et al., 2010), é expectável que esta se traduza também num intervalo de valores elevados de sHER-2 bastante amplo. Em relação às cadelas saudáveis, a percentagem de animais com valores elevados aumentados de HER-2 no soro foi de 42,1%, valor também bastante superior aos 22,2% descritos para a Mulher (Lam et al., 2012). No entanto, há que referir que outras condições podem conduzir ao aumento de sHER-2. De facto, na Mulher, a presença de cancro de estômago, de ovários ou piómetras podem resultar no aumento de sHER-2 (Gutierrez & Schiff, 2011). Assim, estas afeções poderão explicar a ocorrência de níveis elevados de sHER-2 em cadelas que serviram de controlo negativo nas quais a presença de alguma delas não tenha sido detetada.

Adicionalmente, não se encontrou uma diferença estatisticamente significativa entre os níveis de sHER-2 no grupo de cadelas doentes e os valores obtidos para os animais saudáveis ( $p\text{-value} = 0,849$ ). Este resultado pode dever-se a razões de vária ordem: o facto da amostra analisada ser de pequena dimensão; a possível ocorrência de falsos positivos devido à presença de hemólise ou de outras condições que provoquem o aumento dos níveis de HER-2 no soro; ou a ocorrência de falsos negativos devido a erros técnicos.

Relativamente à concordância entre a técnica de IHQ e o *Dot Blot*, não se obteve uma correlação estatisticamente significativa entre as duas metodologias - quando se consideraram

os vários *scores* existentes na IHQ,  $p\text{-value} = 0,411$  (0,1+, 2+ e 3+) e  $p\text{-value} = 0,656$  quando se admitiram apenas duas classes de resultados (positivo e negativo).

De facto, na origem desta discordância podem estar diversas causas, nomeadamente a presença de TM's classificados como HER-2- na IHQ e HER-2+ no *Dot Blot*. Na realidade, esta situação foi a mais prevalente, sendo que a explicação pode ficar a dever-se à possibilidade de TM's classificados como HER-2- na IHQ (positividade apenas quando o tumor apresenta mais de 30% de células com forte marcação membranar, segundo Peña et al., 2014) possuírem um número suficiente de células positivas para o HER-2 no seio do TMP capazes de produzirem quantidades suficientes de HER-2 detetáveis no soro (Lam et al., 2012). Em boa verdade, a definição do nível de positividade para o HER-2 nos tecidos tem sido um tema alvo de grande debate ao longo dos tempos (Wolff et al., 2007; Wolff et al., 2013).

De forma semelhante, a heterogeneidade tumoral também pode contribuir para esta discordância, uma vez que tumores classificados como HER-2- podem conter populações celulares com níveis elevados de expressão do HER-2 (Carney et al., 2013). Adicionalmente, os TMC's com *score* 2+ na IHQ (considerados HER-2-) podem, eventualmente, representar tumores que seriam considerados HER-2+ caso fosse realizada a reavaliação do *status* HER-2 pelas técnicas de hibridização *in situ*, como recomendam as *guidelines* da ASCO (Wolff et al., 2013).

O aumento da expressão do HER-2 em TMC's malignos a nível do mRNA (Ahern et al., 1996) representa a primeira descoberta relativamente à influência do HER-2 na oncologia mamária canina. Porém, enquanto estes resultados indiciam a amplificação do HER-2 nesta doença, outros estudos sugerem que a sobre-expressão do recetor poderá não estar associada à amplificação do gene HER-2, situação que ocorre na Mulher. Na verdade, Martín de las Mulas e colegas (2003) identificaram a ausência de amplificação do HER-2 (pela técnica de CISH) em carcinomas caninos classificados como positivos (*score* 3+) na IHQ. De forma semelhante, na espécie felina, foi demonstrado, através da técnica de FISH, a não amplificação do gene HER-2 nos TMC's HER-2+ (Soares et al., 2013).

Adicionalmente, as características do Ac primário utilizado, principalmente no que respeita à sua afinidade e especificidade, têm influência nos resultados (Pallud et al., 2005). Neste estudo, utilizou-se o Ac primário SP3 anti-HER-2 que, na Mulher, apresenta uma sensibilidade e especificidade superior a 95% (Nunes et al., 2013). Apesar dos estudos existentes na Mulher comprovarem a fiabilidade do Ac SP3 na determinação da sobre-expressão do HER-2 nos TM's, não se encontrou nenhum estudo na espécie canina que tenha usado este Ac, limitando as possibilidades de comparação com os resultados

encontrados no nosso estudo. Contudo, importa referir que os resultados obtidos comprovam a existência de reatividade cruzada entre o anticorpo SP3 e os Ag caninos.

Por outro lado, tendo em conta que os controlos positivos utilizados foram provenientes da espécie felina (sHER-2-felino), a afinidade do Ac SP3 pode diferir para a espécie canina, resultando na ocorrência de algum grau de disparidade do sinal entre os *dots* dos controlos positivos e os *dots* das amostras analisadas e, portanto, na diminuição da acurácia da avaliação realizada.

Adicionalmente, considerando que o *cutoff* de positividade ( $> 15$  ng/ml) adotado foi o definido para a Mulher, é natural que este não seja o ideal para a espécie canina. De facto, o aumento do *cutoff* resulta numa diminuição dos resultados falsos positivos, resultando numa melhor correlação entre o *status* HER-2 nos tecidos e os níveis de sHER-2 (Lam et al., 2012; Sørensen et al., 2013).

Finalmente, a reduzida dimensão da amostra, principalmente no que respeita ao pequeno número de tumores classificados como HER-2+ na IHQ, aliado aos fatores implicados na origem de resultados falsos positivos e falsos negativos no *Dot Blot* anteriormente referidos, participam da assimetria encontrada entre os resultados das técnicas analisadas.

Após a obtenção dos níveis de HER-2 sérico, analisou-se a associação a diversas variáveis clínico-patológicas como a idade, a raça, a classificação histológica, o grau de malignidade e o tamanho tumoral. Verificou-se que, na amostra em estudo, houve uma associação estatisticamente significativa com o tamanho tumoral. Esta correlação foi obtida nas duas abordagens analisadas, sendo que a divisão do tamanho por classes ( $p$ -value = 0,036) e expresso em mm ( $p$ -value = 0,032) se associaram, com um grau razoável de significância, com níveis aumentados de sHER-2. Foi assim possível relacionar o maior tamanho tumoral com maiores concentrações de sHER-2, facto já descrito nos TM's HER-2+ na Mulher (Pallud et al., 2005), sendo que estes autores obtiveram uma correlação positiva entre os níveis aumentados de sHER-2 ( $> 15$  ng/ml) e os tumores com tamanho superior a 28-30 mm.

No presente estudo, 4 tumores apresentaram tamanho superior a 5 cm (inserindo-se na categoria T3), nomeadamente, um carcinosarcoma com 18 cm (sHER-2 = 40,55 ng/ml), um carcinoma simples tubular com 6 cm (sHER-2 = 31,21 ng/ml), um carcinoma complexo com 5,2 cm (sHER-2 = 55,59 ng/ml) e um carcinoma simples túbulo-papilífero com 6 cm (sHER-2 = 45,14 ng/ml). Todos estes tumores apresentaram níveis de sHER-2 bastante elevados, contribuindo para a correlação estatística encontrada. Ainda em relação ao tamanho tumoral, há que salientar os resultados obtidos nos estudos realizados na espécie canina. Neste contexto, importa destacar o estudo de Martín de las Mulas et al. (2003), no qual os 3 carcinomas classificados como HER-2+ na IHQ apresentaram um diâmetro superior a 3 cm,

indo ao encontro dos resultados do nosso estudo e àqueles publicados por Pallud et al. (2005). Também, Gama, Alves e Schmitt (2008) referem o facto dos TMC's com sobre-expressão do HER-2 se encontrarem, geralmente, associados a indicadores de mau prognóstico, como o grande tamanho tumoral.

Relativamente às restantes variáveis analisadas, não se obteve nenhuma outra associação estatisticamente significativa, o que, em parte, pode ficar a dever-se ao facto da amostra em estudo ser de reduzida dimensão. No entanto, há que salientar que o TMC com o maior diâmetro encontrado, correspondente a um carcinosarcoma, apresentou uma das concentrações mais elevadas de sHER-2. Curiosamente, Gama et al. (2008) associaram o tipo histológico carcinosarcoma com os TMC's com sobre-expressão do HER-2.

Assim sendo, no futuro, o aumento da amostra poderá constituir a solução para uma melhor análise das diversas variáveis clínico-patológicas.

Para concluir, a relação entre os TMC's com sobre-expressão do HER-2 e os indicadores de OS e DFS também tem vindo a ser alvo de estudo. Os resultados discordantes das publicações existentes não permitem, ainda, retirar conclusões no que respeita à influência que os TMC's HER-2+ exercem no *outcome* clínico destes animais. Enquanto alguns autores defendem que existe uma relação entre os TMC's HER-2+ e um melhor prognóstico (Gama et al., 2004; Hsu et al., 2009), outros referem que este subtipo tumoral se associa com um pior DFS (Martín de las Mulas et al., 2003) ou, ainda, que estes tumores não se correlacionam com a sobrevivência total ou com um pior prognóstico (Ressel et al., 2013).

No estudo agora apresentado também não foi possível evidenciar uma relação entre os TMC's com níveis elevados de sHER-2 ( $> 15$  ng/ml) e a OS e o DFS. O reduzido número de mortes registadas (5 em 20 dos casos em que o *follow-up* foi possível), aliado às taxas de mortalidade (16,6% no grupo com sHER-2  $\geq$  a 15 ng/ml *versus* 12,5% no grupo com níveis de sHER-2  $< 15$  ng/ml, no primeiro ano pós-cirúrgico) e de recidiva (41,6% no grupo com níveis elevados de sHER-2 *versus* 50% no grupo sem níveis elevados de sHER-2), muito semelhantes nos dois grupos de animais, não permitiram estabelecer uma correlação entre níveis aumentados de sHER-2 e os dois indicadores analisados.

## VI. Conclusões

O papel que o HER-2 desempenha na tumorigénese mamária canina tem vindo a ser alvo de estudo nos últimos anos, sendo que a sua relevância clínica não foi, até à data, claramente esclarecida.

Na Mulher, as pacientes com TM's HER-2 positivos tendem a apresentar um prognóstico desfavorável. Na espécie canina, alguns estudos relacionam a sobre-expressão do HER-2 com características clínicas de pior prognóstico, enquanto outros revelam uma associação com indicadores mais favoráveis, traduzindo uma grande variabilidade de resultados associados a este recetor. Adicionalmente, as diferentes metodologias e sistemas de classificação adotados têm contribuído para a variabilidade encontrada, remetendo para a importância da padronização dos métodos de diagnóstico disponíveis.

Em Medicina Humana, a evolução e a validação das várias técnicas moleculares acontece a um ritmo bastante mais célere do que em Medicina Veterinária. Este estudo vem contribuir para justificar a continuação do desenvolvimento e da otimização do *Dot Blot*, um método potencialmente mais adequado à prática clínica nos animais de companhia, uma vez que apresenta vantagens importantes, com um menor custo associado, comparativamente às técnicas de IHQ, FISH e ELISA.

O presente estudo permitiu concluir que os níveis aumentados de sHER-2, nas cadelas com TM, estão associados com características que se relacionam com um pior prognóstico, como o maior tamanho tumoral. Assim, torna-se interessante a exploração de novas abordagens terapêuticas, nomeadamente as dirigidas contra o HER-2, já largamente implementadas no diagnóstico e tratamento dos TM's HER-2+ na Mulher.

No entanto, a carência de resultados científicos que corroborem estes achados e o facto de não existirem outros estudos que tenham utilizado o *Dot Blot* para a quantificação do sHER-2-canino remetem para a necessidade de mais ensaios nesta área, no sentido de se estabelecer um conjunto de resultados comparáveis entre si. Paralelamente, a necessidade de encontrar um limiar de positividade adequado à espécie canina para a avaliação dos níveis de sHER-2 constitui um parâmetro de extrema importância para que se possa melhorar o diagnóstico dos TMC's HER-2+.

## Bibliografia

- Abcam (2015). *Dot blot protocol*. Acedido em Junho 22, 2015, disponível em <http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/Dot%20blot%20protocol.pdf>
- Ahern, T.E., Bird, R.C., Allison, E., Bird, E.C. & Wolfe, L.G. (1996). Expression of the oncogene c-erbB2 in canine mammary cancers and tumor-derived cell lines. *Amer J Vet Res*, 57 (5), 693-696.
- Aigner, A., Juhl, H., Malerczyk, C., Tkybusch, A., Benz, C.C. & Czubayko, F. (2001). Expression of a truncated 100 kDa HER2 splice variant acts as an endogenous inhibitor of tumour cell proliferation. *Oncogene*, 20, 2101-2111.
- Akiyama, T., Sudo, C., Ogawara, H., Toyoshima, K. & Yamamoto, T. (1986). The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science*, 232 (4758), 1644-6.
- Ali, S.M., Carney, W.P., Esteva, F.J., Fournier, M., Harris, L., Köstler, W.J. & Lipton, A. (2008). Serum HER-2/neu and relative resistance to trastuzumab-based therapy in patients with metastatic breast cancer. *Cancer*, 113 (6), 1294-301.
- Allen, S.W., Prasse, K.W. & Mahaffey, E.A. (1986). Cytologic differentiation of benign from malignant canine mammary tumors. *Vet Pathol*, 23, 649-655.
- Alroy, I. & Yardem, Y. (1997). The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett*, 410, 83-86.
- Andersen, A.C. & Rosenblatt, L.S. (1969). The effect of whole-body x-irradiation on the median lifespan of female dogs (beagles). *Radiation Research*, 39, 1, 177-200.
- Andrechek, E.R., White, D. & Muller, W.J. (2005). Targeted disruption of HER-2/Neu in the mammary epithelium results in impaired ductal outgrowth. *Oncogene*, 24, 932-937.
- Aughey, E. (2001). Female reproductive system – mammary glands. In E. Aughey & F.L. Frye, *Comparative veterinary histology – with clinical correlates*. (pp. 194). UK: Manson Publishing.
- Banks, W.J. (1986). Integumentary system. In W.J. Banks (Ed.), *Applied veterinary histology* (2nd ed.). (pp. 361 e 364). USA: Williams & Wilkins.
- Baselga, J., Gelmon, K.A., Verma, S., Wardley, A., Conte, P., Miles, D., Bianchi, G., Cortes, J., McNally, V.A., Ross, G.A., Fumoleau, P. & Gianni, L. (2010). Phase II trial of pertuzumab and trastuzumab in patients with human epidermal growth factor receptor 2–positive metastatic breast cancer that progressed during prior trastuzumab therapy. *J Clin Oncol*, 28, 1138-1144.
- Bazley, L.A. & Gullick, W.J. (2005). The epidermal growth factor receptor family. *Endocrine-related Cancer*, 12, S17-27.
- Bears, J.J., Schulman, F.Y., Carter, D. (2012). Histologic, immunohistochemical, and clinical features of 27 mammary tumors in 18 male dogs. *Vet Pathol*, 49 (4), 602-607.

- Beha, G, Brunetti, B., Asproni, P., Muscatello, L.V., Millanta F., Poli, A., Sarli G. & Benazzi, C. (2012). Molecular portrait-based correlation between primary canine mammary tumor and its lymph node metastasis: possible prognostic-predictive models and/or stronghold for specific treatments? *BMC Veterinary Research*, 8, 219.
- Benjamin, S.A., Lee, A.C. & Saunders, W.J. (1999). Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles. *Vet Pathol*, 36, 423-436.
- Ben-Levy, R., Paterson, H.F., Marshall, C.J. & Yarden, Y. (1994). A single autophosphorylation site confers oncogenicity to the Neu/ErbB-2 receptor and enables coupling to the MAP kinase pathway. *The EMBO Journal*, 13 (14), 3302-3311.
- Bewick, M., Conlon, M., Gerard, S., Lee, H., Parissenti, A.M., Zhang, L., Gluck, S. & Lafrenie, R.M. (2001). HER-2 expression is a prognostic factor in patients with metastatic breast cancer treated with a combination of high-dose cyclophosphamide, mitoxantrone, paclitaxel and autologous blood stem cell support. *Bone Marrow Transplantation*, 27, 847-853.
- Blackwell, K.L., Burstein, H.J., Storniolo, A.M., Rugo, H., Sledge, G., Koehler, M., Ellis, C., Casey, M., Vukelja, S., Bischoff, J., Baselga, J. & O'Shaughnessy, J. (2010). Randomized study of lapatinib alone or in combination with trastuzumab in women with ErbB2-positive, trastuzumab-refractory metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 28, 1124-1130.
- Bragulla, H., Budras, K.D., Mulling, C., Reese, S. & König, H.E. (2004). Tegumento comum. In H.E. König & H. Liebich (Eds.), *Anatomia dos animais domésticos – texto e atlas colorido*. (pp. 335-341). Porto Alegre: Artmed.
- Bramwell, V.H.C., Doig, G.C., Tuck, A.B., Wilson, S.M., Tonkin, K.S., Tomiak, A., Perera, F., Vandenberg, T.A., Chambers, A.F. (2009). Changes over time of extracellular domain of HER2 (ECD/HER2) serum levels have prognostic value in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 114, 503-511.
- Britsch, S., Li L., Kirchhoff, S., Theuring, F., Brinkmann, V., Birchmeier, C. & Riethmacher, D. (1998). The ErbB2 and ErbB3 receptors and their ligand, neuregulin-1, are essential for development of the sympathetic nervous system. *Genes Dev*, 12 (12), 1825-36.
- Bostock, D.E. (1975). The Prognosis Following the Surgical Excision of Canine Mammary Neoplasms. *Europ. J. Cancer*, 11, 389-396.
- Burden, S. & Yarden, Y. (1997). Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron*, 18, 847-855.
- Carlsson, J., Nordgren, H., Sjostrom, J., Wester, K., Villman, K., Bengtsson, N.O., Ostenstad, B., Lundqvist, H. & Blomqvist, C. (2004). HER2 expression in breast cancer primary tumours and corresponding metastases. Original data and literature review. *British Journal of Cancer*, 90, 2344-2348.
- Carney, W. P., Neumann, R., Lipton, A., Leitzel, K., Ali, S. & Price, C. P. (2003). Potential clinical utility of serum HER-2 / neu oncoprotein concentrations in patients with breast cancer. *Clinical Chemistry*, 49 (10), 1579-1598.

- Carney, W. P., Neumann, R., Lipton, A., Leitzel, K., Ali, S. & Price, C. P. (2004). Monitoring the circulating levels of the HER2/neu oncoprotein in breast cancer. *Clinical Breast Cancer*, 5 (2), 105-116.
- Carney, W.P., Bernhardt, D. & Jasani, B. (2013). Circulating HER2 extracellular domain: a specific and quantitative biomarker of prognostic value in all breast cancer patients? *Biomarkers in Cancer*, 5, 31-39.
- Chang, S.C., Chang, C.C., Chang, T.J., Wong, M.L. (2005). Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002). *J Am Vet Med Assoc*, 227, 1625-1629.
- Cho, H., Mason, K., Ramyar, K.X., Stanley, A.M., Gabelli, S.B., Denney, D.W. & Leahy, D.J. (2003). Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the herceptin fab. *Nature*, 421 (6924), 756-60.
- Christianson, T.A., Doherty, J.K., Lin, Y.J., Ramsey, E.E., Holmes, R., Keenan, E.J. & Clinton, G.M. (1998). NH2-terminally truncated HER-2/neu protein: relationship with shedding of the extracellular domain and with prognostic factors in breast cancer. *Cancer Research*, 58, 5123-5129.
- Chu, L.L., Rutteman, G.R., Kong, M.C., Ghahremani, M., Schmeing, M., Misdorp, W., van Garderen, E. & Pelletier, J. (1998). Genomic organization of the canine p53 gene and its mutational status in canine mammary neoplasia. *Breast Cancer Research Treatment*, 50, 11-25.
- Chun, R. & Garret, L. (2005). Urogenital and mammary gland tumors. In S. J. Ettinger & E.C. Feldman (Eds.), *Textbook of veterinary internal medicine*. (6th ed.). (pp. 788-789). Missouri: Elsevier Saunders.
- Chung, C. & Christianson, M. (2014). Predictive and prognostic biomarkers with therapeutic targets in breast, colorectal, and non-small cell lung cancers: A systemic review of current development, evidence, and recommendation. *J Oncol Pharm Practice*, 20 (1), 11-28.
- Citri, A. & Yarden, Y. (2006). EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 505-16.
- Classen, S., Kopp, R., Possinger, K., Weidenhagen, R., Eiermann, W. & Wilmanns, W. (2002). Clinical relevance of soluble c-erbB-2 for patients with metastatic breast cancer predicting the response to second-line hormone or chemotherapy. *Tumor Biol*, 23, 70-75.
- Clemente, M., Pérez-Alenza, M.D., Hiera, J.C. & Peña, L. (2010). Histological, immunohistological, and ultrastructural description of vasculogenic mimicry in canine mammary cancer. *Veterinary Pathology*, 47, 265-274.
- Codony-Servat, J., Albanell, J., Lopez-Talavera, J.C., Arribas, J. & Baselga, J. (1999). Cleavage of the HER2 ectodomain is a pervanadate-activable process that is inhibited by the tissue inhibitor of metalloproteases-1 in breast cancer cells. *Cancer Research*, 59, 1196-1201.
- Coelho, N. (2013). *Quantificação do domínio extracelular do oncogene HER2 no soro de gatas com carcinomas mamário – otimização e relevância clínica*. Tese de Mestrado

Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.

Colomer, R., Llombart-Cussac, A., Lluch, A., Barnadas, A., Ojeda, B., Carañana, V., Fernández, Y., García-Conde, J., Alonso, S., Montero, S., Hornedo, J. & Guillem, V. (2004). Biweekly paclitaxel plus gemcitabine in advanced breast cancer: phase II trial and predictive value of HER2 extracellular domain. *Annals of Oncology*, 15, 201-206.

Costa, M.M. (2010). *Estudo epidemiológico e anatomo-patológico de tumores mamários na cadela e na gata*. Tese de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.

Cunningham, J.G. (2002). *Textbook of veterinary physiology*. (3rd ed.). (pp.407-409). Philadelphia: W.B. Saunders Company.

Cunningham, J.G. (2007). The mammary gland. In J.G. Cunningham & B.G. Klein, *Textbook of veterinary physiology*. (4th ed.). (pp. 505 e 514). Missouri: Saunders Elsevier.

Dabbs, D. (2006) Immunohistology of the breast. In D. Dabbs (Ed.), *Diagnostic immunohistochemistry* (2nd ed.). (pp. 732-734). Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier.

De Abreu, F.B., Wells, W.A. & Tsongalis, G.J. (2013). The emerging role of the molecular diagnostics laboratory in breast cancer personalized medicine. *Am J Pathol*, 183, 1075-1083.

Di Leo, A., Gancberg, D., Larsimont, D., Tanner, M., Jarvinen, T., Rouas, G., Dolci, S., Leroy, J., Paesmans, M., Isola, J. & Piccart, M. (2002). HER-2 amplification and topoisomerase II $\alpha$  gene aberrations as predictive markers in node-positive breast cancer patients randomly treated either with an anthracycline-based therapy or with cyclophosphamide, methotrexate, and 5-fluorouracil. *Clinical Cancer Research*, 8, 1107-1116.

Di Leo, A., Desmedt, C., Bartlett, J.M.S., Piette, F., Ejlertsen, B., Pritchard, K.I., Larsimont, D., Poole, C., Isola, J., Earl, H., Mouridsen, H., O'Malley, F.P., Cardoso, F., Tanner, M., Munro, A., Twelves, C.J., Sotiriou, C., Shepherd, L., Cameron, D., Piccart, M.J. & Buyse, M. (2011). HER2 and TOP2A as predictive markers for anthracycline-containing chemotherapy regimens as adjuvant treatment of breast cancer: a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*, 12, 1134-42.

Dobson, J.M. (1993). Chemotherapy in the management of solid tumours. In J.M. Dobson & N.T. Gorman (Eds.), *Cancer chemotherapy in small animal practice*. (pp. 142). Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Dobson, J.M., Samuel, S., Milstein, H., Rogers, K., Wood, J.L.N. (2002). Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs, *J Small Anim Pract*, 43, 240-246.

Dobson, J.M. (2013). Breed-predispositions to cancer in pedigree dogs. *ISRN Veterinary Science*, 941275.

Dorn, C.R., Taylor, D.O.N., Frye, F.L., Hibbard, H.H. (1968) Survey of animal neoplasms in alameda and contra costa counties, California. I. Methodology and description of cases. *J Nat Cancer Inst*, 40, 295-305.

- Dowsett, M., Hanna, W.M., Kockx, M., Penault-Llorca, F., Ruschoff, J., Gutjahr, T., Habben, K. & van de Vijver, M. J. (2007). Standardization of HER2 testing: results of an international proficiency-testing ring study. *Modern Pathology*, 20, 584-591.
- Duffy, M. J., McKiernan, E., O'Donovan, N. & McGowan, P. M. (2009). Role of ADAMs in cancer formation and progression. *Clin Cancer Res*, 15 (4), 1140-4.
- Dutra, A.P., Granja, N.V., Schmitt, F.C & Cassali, G.D. (2004). c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37, 1673-1681.
- Euler, H.V. (2011). Tumours of the mammary glands. In J. M. Dobson & B. D. Lascelles, *BSAVA Manual of canine and feline oncology*. (3rd ed.). (pp. 237-242). UK: BSAVA.
- Edwards, D.R., Handsley, M.M. & Pennington, C.J. (2008). The ADAM metalloproteinases. *Molecular Aspects of Medicine*, 29, 258-89.
- Egenvall, A., Bonnett, B.N., Ohagen, P., Olson, P., Hedhammar, A. & von Euler, H. (2005). Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Prev Vet Med*, 69, 109-127.
- Erickson, S.L., O'Shea, K.S., Ghaboosi, N., Loverro, L., Frantz, G., Bauer, M., Lu, L.H. & Moore, M.W. (1997). ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with ErbB2-and-heregulin-deficient mice. *Development*, 124, 4999–5011.
- Eroles, P., Bosch, A., Pérez-Fidalgo, J.A., Lluch, A. (2012). Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev*, 38 (6), 698-707.
- Escobar, H.M., Becker, K., Bullerdiek, J. & Nolte, I. (2001). The canine HER-2 gene maps to a chromosome region frequently affected by aberrations in tumors of the dog (*Canis familiaris*). *Cytogenet Cell Genet*, 94, 194–195.
- Esteva, F.J., Cheli, C.D., Fritsche, H., Fornier, M., Slamon, D., Thiel, R.P. & Ghani, F. (2005). Clinical utility of serum HER2/neu in monitoring and prediction of progressionfree survival in metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab-based therapies. *Breast Cancer Research*, 7, 436–443.
- Fehm, T., Maimonis, P., Weitz, S., Teramoto, Y., Katalinic, A. & Jäger, W. (1997). Influence of circulating c-erbB-2 serum protein on response to adjuvant chemotherapy in nodepositive breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, 43, 87-95.
- Fehm, T., Gebauer, G. & Jäger, W. (2002). Clinical utility of serial serum c-erbB-2 determinations in the follow-up of breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, 75, 97-106.
- Finn, R.S., Gagnon, R., Di Leo, A., Press, M.F., Arbushites, M. & Koehler, M. (2009). Prognostic and predictive value of HER2 extracellular domain in metastatic breast cancer treated with lapatinib and paclitaxel in a randomized phase III study. *J Clin Oncol*, 27, 5552-5558.

- Fossum, T.W. (2007). Surgery of the reproductive and genital systems. In T.W. Fossum, C.S. Hedlund, A.L. Johnson, K.S. Schulz, H.B. Seim III, M.D. Willard, A. Bahr, G.L. Carrol (Eds.), *Small animal surgery* (3rd ed.). (pp.729-739). Missouri, UK: Mosby Elsevier.
- Frimberger, A.E. (2005). Principles of chemotherapy. In S.J. Ettinger & E.C. Feldman, *Textbook of veterinary internal medicine*. (6th ed.). (pp. 708). Missouri: Elsevier Saunders.
- Fumagalli, D., Blanchet-Cohen, A., Brown, D., Desmedt, C., Gacqer, D., Michiels, S., Rothé, F., Majjaj, S., Salgado, R., Larsimont, D., Ignatiadis, M., Maetens, M., Piccart, M., Detours, V., Sotiriou, C. & Haib-Kains, B. (2014). Transfer of clinically relevant gene expression signatures in breast cancer: from affymetrix microarray to illumina RNA-sequencing technology. *BMC Genomics*, 14, 1008.
- Gama, A., Alves, A. & Schmitt F. (2008). Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Arch*, 453, 123-132.
- Garratt, A.N., Ozcelik, C. & Birchmeier, C. (2003). ErbB2 pathways in heart and neural diseases. *Trends Cardiovasc Med*, 13 (2), 80-6.
- Garrett, T.P.J., McKern, N.M., Lou, M., Elleman, T.C., Adams, T.E., O. Lovrecz, J., Kofler, M., Jorissen, R.N., Nice, E.C. & Burgess, A.W. (2003). The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Molecular Cell*, 11, 495-505.
- Gassmann, M., Casagrande, F., Orioli, D., Simon, H., Lai, C., Klein, R. & Lemke, G. (1995). Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature*, 378 (6555), 390-394.
- GenBank (2015). *Canis lupus familiaris mRNA for ERBB-2, complete cds*. Acedido em Maio, 2, 2015, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB008451.1>
- Goldschmidt, M., Peña, L. Rasotto, R. & Zappulli, V. (2011). Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*, 48, 117-131.
- Graus-Porta, D., Beerli, R.R. & Hynes, N.E. (1995). Single-chain antibody-mediated intracellular retention of ErbB-2 impairs Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 15 (3), 1182-1191.
- Graveel, C.R., Calderone, H.M., Westerhuis, J.J., Winn, M.E. & Sempere, L.F. (2015). Critical analysis of the potential for microRNA biomarkers in breast cancer management. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 7, 59-79.
- Guil-Luna, S., Sanchez-Cespedes, R., Millan, Y., De Andres, F.J., Rollon, E., Domingo, V., Guscetti, F. & Martin de Las Mulas, J., (2011). Aglepristone decreases proliferation in progesterone receptor-positive canine mammary carcinomas. *J Vet Intern Med*, 25, 518-523.
- Guiu, S., Michiels, S., André, F., Cortes, J., Denkert, C., Di Leo, A., Hennessey, B.T., Sorlie, T., Sotiriou, C., Turner, N., Van de Vijver, M., Viale, G., Loi, S. & Reis-Filho, J.S. (2012). Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement. *Annals of Oncology*, 23, 2997-3006.

- Gutierrez, C. & Schiff, R. (2011). HER 2: biology, detection, and clinical Implications. *Arch Pathol Lab Med*, 135 (1), 55-62.
- Hampe, J.F. & Misdorp, W. (1974). IX: tumours and dysplasias of the mammary gland. *Bull World Health Organ*, 50, 111-133.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell Press*, 100, 57-70.
- Harris, B. L. N., Liotcheva, V., Broadwater, G., Ramirez, M.J., Maimonis, P., Anderson, S. & Bentley, R.C. (2001). Comparison of methods of measuring HER-2 in metastatic breast cancer patients treated with high-dose chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, 19 (6), 1698-1706.
- Harris, L., Fritsche, H., Mennel, R., Norton, L., Ravdin, P., Taube, S. & Bast, R.C. (2007). American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 25 (33), 5287-312.
- Hayashi, N., Nakamura, S., Tokuda, Y., Yagata, H., Yoshida, A., Ota, H., Hortobagyi, G.N., Cristofanill, M. & Ueno, N.T. (2012). Serum HER2 levels determined by two methods in patients with metastatic breast cancer. *Int J Clin Oncol*, 17 (1), 55-62.
- Hayes, D. F., Yamauchi, H., Broadwater, G., Cirincione, C. T., Rodrigue, S. P., Berry, D. A. & Henderson, I. C. (2001). Circulating HER-2 / erbB-2 / c-neu (HER-2) extracellular domain as a prognostic factor in patients with metastatic breast cancer: cancer and leukemia group B study 8662. *Clinical Cancer Research*, 7, 2703-2711.
- Hellmen, E., Bergstrom, R., Holmberg, L., Spangberg, I.B., Hansson, K. & Lingren, A. (1993). Prognostic Factors in Canine Mammary Tumors: A Multivariate Study of 202 Consecutive Cases. *Vel Pathol*, 30, 20-27.
- Henry, C.J. (2009). Mammary cancer. In D.B., John, C.T., David (Eds), *Kirk's current veterinary therapy* (14th ed.). (pp. 363-368). Missouri: Saunders Elsevier.
- Herschkowitz, J., Simin, K., Weigman, V.J., Mikaelian, I., Usary J., Wu, Z., Rasmussen, K.E., Jones, L.P., Assefnia, S., Chandrasekharan, S., Backlund, Y.Y., Khramtsov, A.I., Bastein R., Quackenbush, J., Glazer, R.I., Brown, P.H., Green, J.E., Kopelovich, L., Furth, P.A., Palazzo, J.P., Olopade, O.I., Bernard, P.S., Churchill, G.A., Dyke, T.V. & Perou, C.M. (2007). Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol*, 8:R76.
- Houssami, N., Macaskill, P., Balleine, R.L., Bilous, M. & Pegram, M.D. (2011). HER2 discordance between primary breast cancer and its paired metastasis: tumor biology or test artefact? Insights through meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*, 129, 659-674.
- Hsu, W.L., Huang, H.M., Liao, J.W., Wong, M.L., Chang, S.C. (2009) 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. *The Veterinary Journal*, 180, 116-123.
- Hynes, N.E. & Lane, H.A. (2005) ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nature Reviews in Cancer*, 5 (5), 341-354.

Imoto, S., Wada, N., Hasebe, T., Ochiai, A. & Kitoh, T. (2006). Serum c-erbB-2 protein is a useful marker for monitoring tumor recurrence of the breast. *Int. J. Cancer*, 120, 357-361.

James, R., Thriveni, K., Ramaswamy, G., Krishnamoorthy, L., Mukherjee, G., Vijayalaxmi Deshmane, P.P. & Bapsy, P. (2008). Evaluation of immunohistochemistry and enzyme linked immunosorbent assay for HER-2/neu expression in breast carcinoma. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 23 (4), 345-351.

Järvinen, T.A. & Liu, E.T. (2003). HER-2/neu and topoisomerase IIalpha in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 78, 299-311.

Jensen, B.V., Johansen, J.S. & Price, P.A. (2003). High levels of serum HER-2/neu and YKL-40 independently reflect aggressiveness of metastatic breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 9, 4423-4434.

Jitpean, S., Hagman, R., Holst, B.S., Hoglund, O.V., Pettersson, A. & Egenvall, A. (2012). Breed Variations in the Incidence of Pyometra and Mammary Tumours in Swedish Dog. *Reprod Dom Anim*, 47, 347-350.

Jones, F.E. & Stern, D.F. (1999). Expression of dominant-negative ErbB2 in the mammary gland of transgenic mice reveals a role in lobuloalveolar development and lactation. *Oncogene*, 18, 3481-3490.

Jones, J.T., Akita, R.W. & Sliwkowski, M.X. (1999) Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors. *FEBS Lett*, 447 (2-3), 227-31.

Jones, T.C., Hunt, R.D., King, N.W. (1997). Genital system. In T.C. Jones, R.D. Hunt, N.W. King, *Veterinary pathology*. (6th ed.). (pp.1192). USA: Lippincott Williams & Wilkins.

Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C., Palmer, N. (1991). *Pathology of Domestic Animals*. (4th ed.). (pp.455). San Diego: Academic Press.

Junqueira, L.C. & Carneiro, J. (2005). The female reproductive system. In L.C. Junqueira & J. Carneiro (Eds.), *Basic Histology*. (11th ed.). (pp.452-454). USA: The McGraw-Hill Companies.

Kallioniemi, O.P., Kallioniemi, A., Kurisu, W., Thor, A, Chen, L.C., Smith, H.S. & Waldman, F.M. (1992). ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 5321-5325.

Karayannopoulou, M., Kaldrymidou, E., Constantinidis, T.C., Dessiris, A. (2001). Adjuvant post-operative chemotherapy in bitches with mammary cancer. *J Vet Med A*, 48, 85-96.

Karayannopoulou, M., Kaldrymidou, E., Constantinidis, T.C., Dessiris, A. (2005) Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. *J Comp Pathol*, 133, 246-252.

Kim, J.H., Im, K.S., Kim, N.H., Yhee, J.Y., Nho, W.G., Sur, J.H. (2011). Expression of HER-2 and nuclear localization of HER-3 protein in canine mammary tumors: histopathological and immunohistochemical study. *The Veterinary Journal*, 189, 318-322.

- Kim, N.H., Lim, H.Y., Im, K.S., Kim, J.H. & Sur, J.H. (2013). Identification of triple-negative and basal-like canine mammary carcinomas using four basal markers. *J Comp Pathol*, 148, 298-306.
- King, C.R., Kraus, M.H. & Aaronson, S.A. (1985). Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science*, 229, 974-976.
- Kong, S., Lee, D.H., Lee, E.S., Park, S., Lee, K.S., Ro, J. (2006). Serum HER2 as a response indicator to various chemotherapeutic agents in tissue HER2 positive metastatic breast cancer. *Cancer Res Treat*, 38 (1), 35-39.
- Kontani, K., Kuroda, N., Hashimoto, S., Murazawa, C., Norimura, S., Tanaka, H., Ohtani, M., Fujiwara-Honjo, N., Kushida, Y., Date, M., Haba, R., Houchi, H., Yamauchi, A. & Yokomise, H. (2013). Clinical usefulness of human epidermal growth factor receptor-2 extracellular domain as a biomarker for monitoring cancer status and predicting the therapeutic efficacy in breast cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 14 (1), 20-28.
- Kurilj, A.G., Hohšteter, M., Artuković B., Severin, K., Šoštarić-Zuckermann, I-C., Beck, A., Seiwerth, S., Sabočanec, R. & Grabarević, Z. (2011). Histopathological evaluation and immunohistochemical study of estrogen receptor  $\alpha$ , HER-2 and Ki-67 in canine neoplastic mammary lesions. *Vet. arhiv*, 81 (6), 709-722.
- Kusewitt, D.F. & Rush, L.J. (2007). Neoplasia and tumor biology. In M.D. McGavin & J.F. Zachary (Eds.), *Pathologic basis of veterinary disease*. (4th ed.). (pp. 253-298). Missouri: Mosby Elsevier.
- Lam, L., McAndrew, N., Yee, M., Fu, T., Tchou, J. C., & Zhang, H. (2012). Challenges in the clinical utility of the serum test for HER2 ECD. *Biochim Biophys Acta*, 1826 (1): 199-208.
- Lana, S.E., Rutteman, G.R. & Withrow, S.J. (2007). Tumors of the mammary gland. In S.J. Withrow & E.G. MacEwen (Eds.), *Small animal clinical oncology* (4th ed.). (pp. 619-634). St. Louis: Saunders Elsevier.
- Lax, I., Bellot, F., Howk, R., Ullrich, A., Givol, D., & Schlessinger, J. (1989). Functional analysis of the ligand binding site of EGF-receptor utilizing chimeric chicken/human receptor molecules. *The EMBO Journal*, 8 (2), 421- 427.
- Lee, K.F., Simon, H., Chen, H., Bates, B., Hung, M.C. & Hauser, C. (1995). Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature*, 378 (6555): 394-8.
- Leitzel, K., Teramoto, Y., Sampson, E., Mauceri, J., Langton, B.C., Demers, L., Podczaski, E., Harvey, H., Shambaugh, S., Volas, G., Weaver, S. & Lipton, A. (1992). Elevated soluble c-erbB-2 antigen levels in the serum and effusions of a proportion of breast cancer patients. *J Clin Oncol*, 10, 1436-1443.
- Leitzel, K., Teramoto, Y., Konrad, K., Chinchilli, V. M., Volas, G., Grossberg, H. & Lipton, A. (1995). Elevated serum c-erbB-2 antigen levels and decreased response to hormone therapy of breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 13 (5), 1129-1135.
- Lennon, S., Barton, C., Banken, L., Gianni, L., Marty, M., Baselga, J. & Leyland-Jones, B. (2009). Utility of serum HER2 extracellular domain assessment in clinical decision making:

- pooled analysis of four trials of trastuzumab in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 27, 1685-1693.
- Lin, N.U. & Winer, E.P. (2007). Brain metastases: The HER2 paradigm. *Clin Cancer Res*, 13, 1648-1655.
- Lipton, A., Leitzel, K., Ali, S.M., Demers, L., Harvey, H.A., Chaudri-Ross, H.A., Evans, D., Lang, R., Hackl, W., Hamer, P. & Carney, W. (2005). Serum HER-2/neu conversion to positive at the time of disease progression in patients with breast carcinoma on hormone therapy. *Cancer*, 104 (2): 257-63.
- Lipton, A., Leitzel, K., Ali, S.M., Carney, W., Platek, G., Steplewski, K., Westlund, R., Gagnon, R., Martin, A.M. & Maltzman, J. (2011). Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) extracellular domain levels are associated with progression-free survival in patients with HER2-positive metastatic breast cancer receiving lapatinib monotherapy. *Cancer*, 117, 5013-20.
- Ludovini, V., Gori, S., Colozza, M., Pistola, L., Rulli, E., Floriani, I., Pacifico, E., Tofanetti, F.R., Sidoni, A., Basurto, C., Rulli, A., & Crinò L. (2008). Evaluation of serum HER2 extracellular domain in early breast cancer patients: correlation with clinicopathological parameters and survival. *Annals of Oncology*, 19 (5): 883-890.
- MacEwen, E.G. & Withrow, S.J. (1996). Tumors of the mammary gland. In E.G. MacEwen & S. J. Withrow, *Small animal oncology* (2nd ed.). (pp.356-361).WB Saunders Company.
- McGeady, T.A. (2006). Male and female reproductive systems – development of the mammary gland. In T.A. McGeady, P.J. Quinn, E.S. FitzPatrick & M.T. Ryan (Eds.), *Veterinary embryology*. (pp. 263-267). Oxford: Blackell Publishing.
- Marques, D. (2013). *Avaliação da expressão da COX-2 em tumores mamários de cadela*. Tese de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa.
- Martín de las Mulas, J., Ordás, J., Millán, Y., Fernández-Soria, V. & Ramón y Cajal, S. (2003). Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Breast Cancer Research and Treatment*, 80, 363-367.
- Martín de las Mulas, J., Millan, Y., Dios, R. (2005). A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor alpha and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. *Vet Pathol*, 42, 200-212.
- Matos, A.J.F., Baptista, C.S., Gartner, M.F. & Ruttemann, G.R. (2012). Prognostic studies of canine and feline mammary tumours: the need for standardized procedures. *The Veterinary Journal*, 193, 24-31.
- Mazouni, C., Hall, A., Broglio, K., Fritsche, H., Andre, F., Esteva, F.J., Hortobagyi, G.N., Buzdar, A.U., Pusztai, L. & Cristofanilli, M. (2007). Kinetics of serum HER-2/neu changes in patients with HER-2-positive primary breast cancer after initiation of primary chemotherapy. *Cancer*, 109, 496-501.

- Mehta, R.R., McDermott, J.H., Hieken, T.J., Marler, K.C., Patel, M.K., Wild, L.D., das Gupta, T.K. (1998). Plasma c-erbB-2 levels in breast cancer patients: prognostic significance in predicting response to chemotherapy. *J Clin Oncol*, 16, 2409-2416.
- Mielke, S., Meden, H. & Kuhn, W. (1998). Expression of the c-erbB-2-encoded oncoprotein p185 (HER-2/neu) in pregnancy as a model for oncogene-induced carcinogenesis. *Medical Hypotheses*, 50, 359-362.
- Miettinen, P.J., Berger, J.E., Meneses, J., Phung, Y., Pedersen, R.A., Werb, Z. & Derynck, R. (1995). Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature*, 376 (6538), 337-341.
- Misdorp, W. (1988) Canine mammary tumours: protective effect of late ovariectomy and stimulating effect of progestins, *Veterinary Quarterly*, 10 (1), 26-33.
- Misdorp, W. (2002). Tumours of the mammary gland. In D.J. Meuten (Ed.), *Tumors in domestic animals* (4th ed.). (pp.575-584). Iowa: Iowa State Press.
- Moasser, M.M. (2007). The oncogene HER2; its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*, 26 (45): 6469-6487.
- Moe, L. (2001). Population-based incidence of mammary tumours in some dog breeds. *J Reprod Fertil Suppl* 57, 439-443.
- Moelans, C. B., de Weger, R. a, Van der Wall, E. & van Diest, P. J. (2011). Current technologies for HER2 testing in breast cancer. *Critical reviews in Oncology/Hematology*, 80, 380-392.
- Monteiro-Riviere, N. A. (1998). Integument. In H.D. Dellmann & J. Eurell (Eds.), *Textbook of veterinary histology* (5th ed.). (pp. 323-325). USA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Morris, J. (2001). Mammary gland. In J., Morris & J. Dobson (Eds.), *Small animal oncology*. (pp.184-190). Oxford: Blackwell Science.
- Morris, J.K., Lin, W., Hauser, C., Marchuk, Y., Getman, D. & Lee KF. (1999). Rescue of the cardiac defect in ErbB2 mutant mice reveals essential roles of ErbB2 in peripheral nervous system development. *Neuron*, 23, 273-283.
- Morris, J.S., Dobson, J.M., Bostock, D.E. (1993). Use of tamoxifen in the control of mammary neoplasia. *Veterinary Record*, 133, 539-542.
- Moulton, J. E., Rosenblatt, L. S., Goldman, M. (1986). Mammary tumors in a colony of beagle dogs. *Vet Pathol*, 23, 741-749.
- Müller, V., Witzel, I., Lück, H.J., Köhler, G., von Minckwitz, G., Möbus, V., Sattler, D., Wilczak, W., Löning, T., Jänicke, F., Pantel, K., Thomssen, C. (2004). Prognostic and predictive impact of the HER-2/neu extracellular domain (ECD) in the serum of patients treated with chemotherapy for metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 86, 9-18.

- Nassar, A., Cohen, C. & Siddiqui, M. (2009). Estimation of hormone receptor status and HER2 in cytologic cell blocks from breast cancer using the novel rabbit monoclonal antibodies (SP1, SP2, and SP3). *Diagn Cytopathol*, 37 (12), 865-870.
- Natali, P.G., Nicotra M.R., Bigotti, A., Ventura, I., Slamon, D.J., Fendly, B.M. & Ullrich, A. (1990). Expression of the p185 encoded by HER2 oncogene in normal and transformed human tissues. *Int. J. Cancer*, 45, 457-46.
- Nemanic, S., London, C.A. & Wisner, E.R. (2006). Comparison of thoracic radiographs and single breath-hold helical CT for detection of pulmonary nodules in dogs with metastatic neoplasia. *J Vet Intern Med*, 20, 508-515.
- Nieto, A., Peña, L., Pérez-Alenza, M.D., Sánchez, M.A., Flores, J.M. & Castaño, M. (2000). Immunohistologic Detection of Estrogen Receptor Alpha in Canine Mammary Tumors: Clinical and Pathologic Associations and Prognostic Significance. *Vet Pathol*, 37, 239-247.
- Nunes, C.B., Rocha, R.M., Buzelin, M.A., Balabram, D., Foureaux, F.S., Porto, S.S. & Gobbi, H. (2013). False positivity in HER-2 testing of breast cancer: novel paths for approaching an old dilemma. *J Clin Pathol*, 66, 946-950.
- Otoni, C.C., Rahal, S.C., Vulcano, L.C., Ribeiro, S.M., Hette, K., Giordano, T., Doiche, D.P. & Amorim, R.L. (2010). Survey radiography and computerized tomography imaging of the thorax in female dogs with mammary tumors. *Acta Vet Scand*, 52, 20.
- Owens, M.A., Horten, B.C., Da Silva, M.M. (2004). HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. *Clinical Breast Cancer*, 5 (1), 63-69.
- Paik, S., Bryant, J., Tan-Chiu, E., Romond, E., Hiller, W., Park, K., Brown, A., Yothers, G., Anderson, S., Smith, R., Wickerham, D.L. & Wolmark N. (2002). Real-world performance of HER2 testing-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. *J Natl Cancer Inst*, 94, 852-4.
- Pallud, C., Guinebretiere, J. M., Guepratte, S., Hacene, K., Neumann, R., Carney, W. & Pichon, M. F. (2005). Tissue expression and serum levels of the oncoprotein HER-2/neu in 157 primary breast tumours. *Anticancer Research*, 25, 1433-1440.
- Park, K., Han, S., Kim, H.J., Kim, J. & Shin, E. (2006). HER2 status in pure ductal carcinoma *in situ* and in the intraductal and invasive components of invasive ductal carcinoma determined by fluorescence *in situ* hybridization and immunohistochemistry. *Histopathology*, 48, 702-707.
- Patsikas, M.N., Karayannopoulou, M., Kaldrymidoy, E., Papazoglou, L.G., Papadopoulou, P.L., Tzegas, S.I., Tziris, N.E., Kaitzis, D.G., Dimitriadis, A.S. & Dessiris, A.K. (2006). The lymph drainage of the neoplastic mammary glands in the bitch: a lymphographic study. *Anat Histol Embryol*, 35, 228-234.
- Payne, R.C., Allard, J.W., Anderson-Mausser, L., Humphreys, J.D., Tenney, D.Y. & Morris, D.L. (2000). Automated assay for HER-2/neu in serum. *Clinical Chemistry*, 46 (2), 175-182.

Pedersen, K., Angelini, P.D., Laos, S., Bach-Faig, A., Cunningham, M.P., Ferrer-Ramón, C. & Arribas, J. (2009). A naturally occurring HER2 carboxy-terminal fragment promotes mammary tumor growth and metastasis. *Molecular and Cellular Biology*, 29 (12), 3319-3331.

Peleteiro, M.C. (1994). Tumores mamários na cadela e na gata. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, LXXXIX (509), 10-34.

Peña, L., Gama, A., Goldschmidt, M.H., Abadie, J., Benazzi, C., Castagnaro, M., Díez, L., Gartner, F., Hellmen, E., Kiupel, M., Millan, Y., Miller, M.A., Nguyen, F., Poli, A., Sarli, G., Zappulli, V. & Martín de las Mulas, J. (2014). Canine mammary tumors: a review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, 51 (1) 127-145.

Penault-Llorca, F., Bilous, M., Dowsett, M., Hanna, W., Osamura, R.Y., Rüschoff, J. & van de Vijver, M. (2009). Emerging technologies for assessing HER2 amplification. *Am J Clin Pathol*, 132, 539-548.

Pérez-Alenza, D., Rutteman, G.R., Peña, L., Beynen, A.C. & Cuesta P. Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. (1998). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 12, 132-139.

Perou, C.M., Sorlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S.X., Lonning, P.E., Borresen-Dale, A.L., Brown, P.O. & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406, 747-752.

Peruzzi, D., Mesiti, G., Ciliberto, G., La Monica, N., Aurisicchio, L. (2010). Telomerase and HER-2/neu as targets of genetic cancer vaccines in dogs. *Vaccine*, 28, 1201-1208.

Philibert, J.C., Snyder, P.W., Glickman, N., Glickman, L.T., Knapp, D.W., Waters, D.J. (2003). Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors, *J Vet Intern Med*, 17, 102-106.

Press, M.F., Cordon-Cardo, C. & Slamon, D.J. (1990). Expression of the HER-2/neu protooncogene in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene*, 5 (7): 953-62.

Real, F.X., Rettig, W.J., Chesa, P.G., Melamed, M.R., Old, L.J. & Mendelsohn, J. (1986). Expression of epidermal growth factor receptor in human cultured cells and tissues: relationship to cell lineage and stage of differentiation. *Cancer Research*, 46, 4726-4731.

Ressel, L., Puleio, R., Loria, G.R., Vannozzi, I., Millanta, F., Caracappa, S., Poli, A. (2013). HER-2 expression in canine morphologically normal, hyperplastic, and neoplastic mammary tissues and its correlation with the clinical outcome. *Research in Veterinary Science*, 94, 299-305.

Rhodes, A., Jasani, B., Anderson, E., Dodson, A.R. & Balaton, A.J. (2002). Evaluation of HER-2/neu Immunohistochemical Assay Sensitivity and Scoring on Formalin-Fixed and Paraffin-Processed Cell Lines and Breast Tumors. A Comparative Study Involving Results From Laboratories in 21 Countries. *Am J Clin Pathol*, 118, 408-417.

- Ricardo, S.A.V., Milanezi, F., Carvalho, S.T., Aguilera, D.R. & Schmitt, F.C.L. (2007). HER-2 evaluation using the novel rabbit monoclonal antibody SP3 and CISH in tissue microarray of invasive breast carcinomas. *J Clin Pathol*, 60, 1001-1005.
- Rivera, P., Melin, M., Biagi, T., Fall, T., Häggström, J., Lindblad-Toh, K. & Von Euler. H. (2009). Mammary tumor development in dogs is associated with BRCA1 and BRCA2. *Cancer Research*, 69, 8770-8774.
- Roche, P.C., Suman, V.J., Jenkins, R.B., Davidson, N.E., Martino, S., Kaufman, P.A., Addo, F.K., Murphy, B., Ingle, J.N., Perez, E.A. (2002). Concordance between local and central laboratory HER2 testing in the breast intergroup trial N983. *J Natl Cancer Inst*, 94, 855-7.
- Ross, J. & Fletcher, J.A. (1998). The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *The Oncologist*, 3, 237-252.
- Ross, J.S., Fletcher, J.A., Bloom, K.J., Linette, G.P., Stec, J., Clark, E., Ayers, M., Symmans, W.F., Pusztai, L. & Hortobagyi, G.N. (2003). HER-2/ neu testing in breast cancer. *Am J Clin Pathol*, 120 (Suppl 1): S53-S71.
- Ross, J.S., Fletcher, J.A., Bloom, K.J., Linette, G.P., Stec, J., Symmans, W.F. & Hortobagyi, G. N. (2004). Targeted therapy in breast cancer: the HER-2/neu gene and protein. *Molecular & Cellular Proteomics*, 3 (4), 379-98.
- Ross, J.S., Slodkowska, E. a, Symmans, W. F., Pusztai, L., Ravdin, P. M., & Hortobagyi, G. N. (2009). The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *The Oncologist*, 14, 320-368.
- Rubin, I. & Yarden, Y. (2001). The basic biology of HER2. *Annals of Oncology*, 12 Suppl 1: S3-8.
- Rundhaug, J.E. (2003). Matrix metalloproteinases, angiogenesis, and cancer. *Clinical Cancer Research*, 9, 551-554.
- Rungsipipat, A., Tateyama, S., Yamaguchi, R., Uchida, K., Miyoshi, N. & Hayashi, T. (1999). Immunohistochemical analysis of c-yes and c-erbB-2 oncogene products and p53 tumor suppressor protein in canine mammary tumors. *J. Vet. Med. Sci*, 61 (1), 27-32.
- Rutteman, G.R., Misdorp, W., Blankenstein, M.A. & van den Brom, W.E. (1988). Oestrogen (ER) and progestin receptors (PR) in mammary tissue of the female dog: different receptor profile in non-malignant and malignant states. *Br J Cancer*, 58, 594-599.
- Saini, K.S., Azim, H.A., Metzger-Filho, O., Loi, S., Sotiriou, C., de Azambujab, E., Piccart, M. (2011). Beyond trastuzumab: New treatment options for HER2-positive breast cancer. *The Breast*, 20, S3, S20-S27.
- Salido, M., Puiggros, A., Corominas, J.M., Iglesias, M., Rodriguez-Rivera, M., Melero, C., Bes, I.T.T., Albanell, J., Serrano, S., Tormo, S.S. & Espinet, B. (2014). Comparison of the 2007 and 2013 ASCO/CAP guidelines for HER2 ISH testing in invasive breast cancer patients. *Annals of Oncology*, 25, iv564–iv573.

- Sanderson, M.P., Dempsey, P.J. & Dunbar, A.J. (2006). Control of ErbB signaling through metalloprotease mediated ectodomain shedding of EGF-like factors. *Growth Factors*, 24 (2): 121-136.
- Sandri, M.T., Johansson, H.A., Zorzino, L., Salvatici, M., Passerini, R., Maisonneuve, P., Rocca, A., Peruzzotti, G., Colleoni, M. (2007). Serum EGFR and serum HER-2/neu are useful predictive and prognostic markers in metastatic breast cancer patients treated with metronomic chemotherapy. *Cancer*, 110 (3): 509-17.
- Santos, A.A., Lopes, C.C., Ribeiro, J.R., Martins, L.R., Santos, J.C., Amorim, I.F., Gartner, F. & Matos, A.J. (2013). Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. *BMC Veterinary Research*, 9, 1.
- Sapino, A., Goia, M., Recupero, D. & Marchiò, C. (2013). Current challenges for HER2 testing in diagnostic pathology: state of the art and controversial issues. *Front Oncol*, 3, 129.
- Sartin, E.A., Barnes, S., Kwapien, R.P. & Wolf, L.G. (1992). Estrogen and progesterone receptor status of mammary carcinomas and correlation with clinical outcome in dogs. *Am J Vet Res*, 53, 2196-2200.
- Sassi, F., Benazzi, C., Castellani, G., Sarli, G. (2010). Molecular-based tumour subtype of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. *BMC Veterinary Research*, 6, 5.
- Sassi, F., Benazzi, C., Castellani, G., Sarli, G. (2010). Molecular-based tumour subtype of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. *BMC Veterinary Research*, 6:5.
- Schneider, R., Dorn, C.R, Taylor, D.O. (1969). Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival, *J Natl Cancer Inst*, 43, 1249-1261.
- Schneider, R. (1970). Comparison of age, sex, and incidence rates in human and canine breast cancer. *Cancer*, 26, 419-426.
- Segatto, O., King, C. R., Pierce, J. H., Di Fiore, P.P. & Aaronson, S.A. (1988). Different structural alterations upregulate in vitro tyrosine kinase activity and transforming potency of the erbB-2 gene. *Molecular and Cellular Biology*, 8 (12), 5570-5574.
- Shao, X., Wang, X., Xu, X., Feng, J., Han, M., Zhang, H., Chen, Z., Wang, S., Zang, Y., Huang, P., Jin, H., Wang, X. (2014). Outcome prediction values of soluble human epidermal growth factor receptor-2 extracellular domain in metastatic breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, 7 (3):1108-1113.
- Sibilia, M., Steinbach, J.P., Stingl, L., Aguzzi, A., & Wagner, E.F. (1998). A strain-independent postnatal neurodegeneration in mice lacking the EGF receptor. *EMBO J*. 17 (3): 719-731.
- Silver, I.A. (1966). The anatomy of the mammary gland of the dog and cat. *J Small Anim Pract*, 7, 689-296.

- Simon, D., Schoenrock, D., Baumgartner, W. & Nolte, I. (2006). Postoperative adjuvant treatment of invasive malignant mammary gland tumors in dogs with doxorubicin and docetaxel. *J Vet Intern Med*, 20, 1184-1190.
- Simon, D., Schoenrock, D., Nolte, I., Baumgärtner, W., Barron, R., Mischke, R. (2009) Cytologic examination of fine-needle aspirates from mammary gland tumors in the dog: diagnostic accuracy with comparison to histopathology and association with postoperative outcome. *Vet Clin Pathol*, 38, 521-528.
- Singer, J., Weichselbaumer, M., Stockner, T., Mechtcheriakova, D., Sobanov, Y., Bajna, E., Wrba, F., Horvat, R., Thalhammer, J.G., Willmann, M., Jensen-Jarolim, E. (2012) Comparative oncology: ErbB-1 and ErbB-2 homologues in canine cancer are susceptible to cetuximab and trastuzumab targeting. *Mol Immunol* (4), 200-9.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A. & McGuire, W.L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER2/neu oncogene. *Science*, 235: 177-182.
- Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J. & Ullrich, A. (1989). Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 244: 707-712.
- Sleeckx, K., Rooster, H., Kroeze, E.J.B.V., Van Ginneken, C. & Van Brantegem, L. (2011) Canine mammary tumours, an overview. *Reprod Domestic Anim*, 46, 1112-1131.
- Sliwkowski, M.X. (2003). Ready to partner. *Nat Struct Biol*, 10(3), 158-9.
- Soares, M., Correia, J., Rodrigues, P., Simões, M. & Matos, A. De. (2013). Feline HER2 protein expression levels and gene status in feline mammary carcinoma: optimization of immunohistochemistry (IHC) and in situ hybridization (ISH) techniques. *Microscopy and Microanalysis*, 19, 876-882.
- Sonnenschein, E.G., Glickman, L.T., Goldschmidt, M.H., McKee, L.J. (1991). Body conformation, diet, and risk of breast cancer in pet dogs: a case-control study. *Am J Epidemiol*, 133, 694-703.
- Sontas, B.H., Ozturk, G.Y., Toydemir, T.F.S., Arun, S.S. & Ekici, H. (2012). Fine-needle aspiration biopsy of canine mammary gland tumours: a comparison between cytology and histopathology. *Reprod Dom Anim*, 47, 125-130.
- Sorenmo, K.U., Shofer, F.S., Goldschmidt, M.H. (2000). Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. *J Vet Intern Med*, 14, 266-270.
- Sorenmo, K. U., Rasotto, R., Zappulli, V., & Goldschmidt, M. H. (2011). Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Veterinary Pathology*, 48 (1), 85-97.
- Sorenmo, K.U., Worley, D.R. Goldschmidt, M.H. (2013). Tumors of the mammary gland. In Withrow, S. J., Vail, D.M. & Page, R.L. *Small animal clinical oncology*. (5th ed.). (pp.538-547). Missouri: Elsevier Saunders.

Sørensen, P.D., Jakobsen, E.H., Madsen, J.S., Petersen, E.B., Andersen, R.F., Østergaard, B., Brandslund, I. (2013). Serum HER-2: sensitivity, specificity, and predictive values for detecting metastatic recurrence in breast cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol*, 139, 1005-1013.

Sørensen, P.D., Jakobsen, E.H., Langkjer, S.T., Bokmand, S., Ostergaard, B., Olsen, D.A. (2009). Serum HER-2 concentrations for monitoring women with breast cancer in a routine oncology setting. *Clin Chem Lab Med*, 47 (9), 1117-1123.

Sørli, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijni, M., Jeffrey, S.S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J.C., O. Brown, P., Botstein, D., Lønning, P.E. & Anne-Lise, B-D. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (19), 10869-10874.

Sørli, T., Tibshirani, R., Parker J., Hastie, T., Marron, J.S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., Demeter, J., Perou, C.M., Lønning, P.E., O. Brown, P., Anne-Lise, B-D. & Botstein, D. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 8418-8423.

Spigel, D.R. & Burstein, H.J. (2002). HER2 overexpressing metastatic breast cancer. *Current Treatment Options in Oncology*, 3, 163-174.

Sternlicht, M. D. & Werb, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17, 463-516.

Stott, D.I. (1989). Immunoblotting and dot blotting. *Journal of Immunological Methods*, 119, 153-187.

Sugano, K., Ushiyama, M., Fukutomi, T., Tsuda, H., Kitoh, T. & Ohkura, H. (2000). Combined measurement of the c-erbB-2 protein in breast carcinoma tissues and sera is useful as a sensitive tumor marker for monitoring tumor relapse. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)*, 89, 329-336.

Tan, L., Xu, Y., Yu, Y., Li, X., Chen, Y. & Feng, Y. (2011). Serum HER2 level measured by Dot Blot: a valid and inexpensive assay for monitoring breast cancer progression. *PloS One*, 6 (4), e18764.

Taylor, G. N., Shabestari, L., Williams, J., Mays, C.W., Angus, W. & McFarland, S. (1976). Mammary neoplasia in a closed beagle colony. *Cancer Research*, 36, 2740-2743.

The University of Arizona (2006). *Experimental techniques – electrophoresis*. Acedido em Setembro 3, 2015, disponível em <http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/Techniques/TechElectrophoresis.htm>.

Towbin, H. & Gordon, J. (1984). Immunoblotting and Dot immunobinding - current status and outlook. *Journal of Immunological Method*, 72, 313- 340.

Tsai, H, Chen, S., Chien, H, Jan, Y., Chao T., Chen, M. & and Hsieh, L. (2012). Relationships between serum HER2 ECD, TIMP-1 and clinical outcomes in Taiwanese breast cancer. *World Journal of Surgical Oncology*, 10, 42.

Tsé, C., Brault, D., Gligorov, J., Antoine, M., Neumann, R., Lotz, J.P. & Capeau, J. (2005). Evaluation of the quantitative analytical methods real-time PCR for HER-2 gene quantification and ELISA of serum HER-2 protein and comparison with fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for determining HER-2 status in breast cancer patients. *Clinical Chemistry*, 51 (7): 1093-101.

Tsé, C., Gauchez, A.-S., Jacot, W. & Lamy, P.-J. (2012). HER2 shedding and serum HER2 extracellular domain: biology and clinical utility in breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 38 (2), 133-42.

Tvedten, H. & Cowell, R.L. (2004). Cytology of neoplastic and inflammatory masses. In M.D. Willard & H. Tvedten (Eds.), *Small animal clinical diagnosis by laboratory methods*. (4th ed.). (pp. 376). Missouri: Saunders.

Tzahar, E., Waterman, H., Chen, X., Levkowitz, G., Karunagaran, D., Lavi, S. & Yarden, Y. (1996). A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Molecular and Cellular Biology*, 16 (10), 5276-87.

Viale, G. (2012). The current state of breast cancer classification. *Annals of Oncology*, 10, 207-210.

Wang, W., Lei, Y., Mei, J., Wang, C. (2015). Recent Progress in HER2 Associated Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 16 (7), 2591-2600.

Weigelt, B., Hu, Z., He, X., Livasy, C., Carey, L.A., Ewend, M.G., Glas, A.M., Perou, C.M. & van't Vee, L.J. (2005). Molecular portraits and 70-gene prognosis signature are preserved throughout the metastatic process of breast cancer. *Cancer Res*, 65 (20): 9155-8.

Wieduwilt, M.J. & Moasser, M.M. (2008). The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics. *Cell Mol Life Sci*, 65 (10): 1566-1584.

Witzel, I., Loibl, S., von Minckwitz, G., Mundhenke, C., Huober, J., Hanusch, C. & Müller, V. (2010). Monitoring serum HER2 levels during neoadjuvant trastuzumab treatment within the GeparQuattro trial. *Breast Cancer Research and Treatment*, 123 (2), 437-45.

Witzel, I., Loibl, S., von Minckwitz, G., Eidtmann, H., Fehm, T., Khandan, F., Schmatloch, S., Hauschild, M., Bischoff, J., Fasching, P.A., Mau, C., Schem, C., Rack, B., MeinholdHeerlein, I., Liedtke, C., Karn, T., Huober, J., Zu Eulenburg, C., Issa-Nummer, Y., Untch, M. & Müller, V. (2012). Predictive value of HER2 serum levels in patients treated with lapatinib or trastuzumab - a translational project in the neoadjuvant GeparQuinto trial. *British Journal of Cancer*, 107, 956-960.

Wolff, A. C., Hammond, M. E. H., Schwartz, J. N., Hagerty, K. L., Allred, D. C., Cote, R. J. & Hayes, D. F. (2007). American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 25 (1), 118-45.

Wolff, A.C., Hammond, M.E.H., Hicks, D.G., Dowsett, M., McShane, L.M., Allison, K.H., Allred, D.C., Bartlett, J.M.S., Bilous, M., Fitzgibbons, P., Hanna, W., Jenkins, R.B., Mangu, P.B., Paik, S., Perez, E.A., Press, M.F., Spears, P.A., Vance, G.H., Viale G. & Hayes, D.F. (2013). Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast

cancer: american society of clinical oncology/college of american pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*, 31 (31): 3997-4013.

Wu, J. M., Fackler, M.J., Halushka, M.K., Molavi, D.W., Taylor, M.E., Teo, W.W., Griffin, C., Fetting, J., Davidson, N.E., De Marzo, A.M., Hicks, J.L., Chitale, D., Ladanyi, M., Sukumar, S. & Argani, P. (2008). Heterogeneity of breast cancer metastases: comparison of therapeutic target expression and promoter methylation between primary tumors and their multifocal metastases. *Clin Cancer Res*, 14(7): 1938-1946.

Yamagami, T., Kobayashi, T., Takahashi, K., Sugiyama, M. (1996). Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification, *J Vet Med Sci*, 58, 1079-1083.

Yarden, Y. & Sliwkowski, M.X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. Nature reviews. *Molecular Cell Biology*, 2, 127-137.

Zabrecky, J. R., Lam, T., McKenzie, S. J., & Carney, W. (1991). The extracellular domain of p185/neu is released from the surface of human breast carcinoma cells, SK-BR-3. *The Journal of Biological Chemistry*, 266, 1716-1720.

Zagozdzon, R., Gallagher, W.M. & Crown, J. (2011). Truncated HER2: implications for HER2-targeted therapeutics. *Drug Discov Today*, 16 (17-18): 810-6.

Zarbo, R.J., Hammond, M.E.H. (2003). Her-2/ neu testing of breast cancer patients in clinical practice. *Arch Pathol Lab Med*, 127, 549-553.

Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P. & Kuriyan, J. (2006). An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell*, 125, 1137-1149.

Zhu, X. & Verma, S. (2015). Targeted therapy in her2-positive metastatic breast cancer: a review of the literature. *Curr Oncol*, 22, S19-28.

## Anexos

### **Anexo 1 – Descrição das atividades desenvolvidas no estágio curricular**

O estágio curricular que permitiu o desenvolvimento deste trabalho decorreu no laboratório do CIISA (Centro Interdisciplinar de Investigação em Sanidade Animal), na FMV-UL (Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa), entre outubro de 2014 e fevereiro de 2015, inclusive.

Na área da Investigação em Oncologia Veterinária, o trabalho realizado versou sobre o cancro mamário na cadela, com o intuito de se classificarem as neoplasias da amostra em estudo quanto ao *status* HER-2.

A aluna realizou a técnica de *Dot Blot* para concretização dos objetivos propostos, tendo para tal sido necessário algum tempo para a otimização desta metodologia. Realizou, também, a recolha de algumas amostras de sangue no Hospital Escolar da FMV-UL, assim como a consulta dos dados constantes nas fichas clínicas dos animais selecionados. Foi possível observar e participar na execução de outras técnicas de laboratório, como o *Western Blot* e a Imuno-histoquímica, e ainda contactar com os procedimentos laboratoriais desenvolvidos noutros laboratórios de Investigação Veterinária nas áreas da Parasitologia e cultura de células.

A seleção deste tema de trabalho ficou a dever-se à grande relevância que apresenta, tanto no contexto da prática clínica de pequenos animais (as neoplasias mamárias na espécie canina apresentam elevada expressão), como em termos de investigação científica no âmbito da Oncologia Comparada.

## Anexo 2 – Resultados da Imuno-histoquímica

Tabela 11 – Resultados da IHQ de todos os tumores analisados e sua correspondência com os valores obtidos no *Dot Blot*.

Casos	IHQ	Concentração de sHER-2 (ng/ml)
1*	1+	8,07
2	2+	0,67
3	1+	40,55
4*	1+	12,12
5	1+	31,21
6*	1+	3,34
7	1+	3,08
8	2+	51,02
9	2+	7,11
10*	2+	0,00
11	1+	0,63
12	1+	0,00
13	1+	22,74
14	1+	1,60
15	1+	21,90
16*	0	74,69
17	0	1,09
18	1+	63,84
19	1+	27,66
20*	0	31,57
21	1+	29,08
22	0	2,03
23	1+	55,59
24	3+	45,14
25	1+	33,58

Tabela 11 – continuação

26*	1+	40,91
27	3+	16,96
28*	1+	96,26
29*	3+	1,98
30	2+	17,47
31	2+	28,47
32	1+	16,23
33*	3+	9,77
34	3+	5,72
35	3+	9,06

Legenda: \* – Soros hemolisados que foram excluídos da análise estatística.

### Anexo 3 – Informações adicionais

Gráfico 8 – Níveis de sHER-2 das cadelas saudáveis incluídas no estudo (N=19).

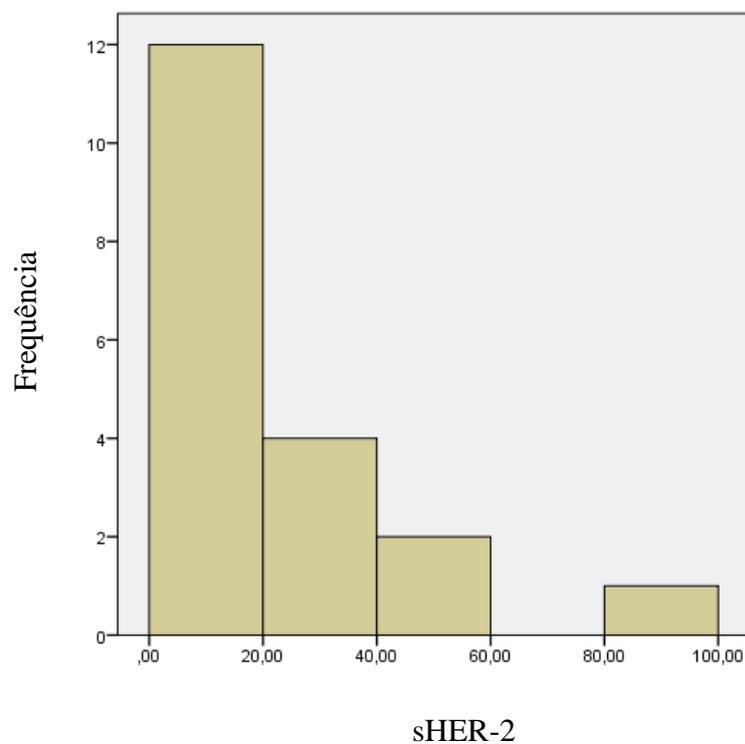


Gráfico 9 – Níveis de sHER-2 das cadelas doentes incluídas no estudo (N=25).

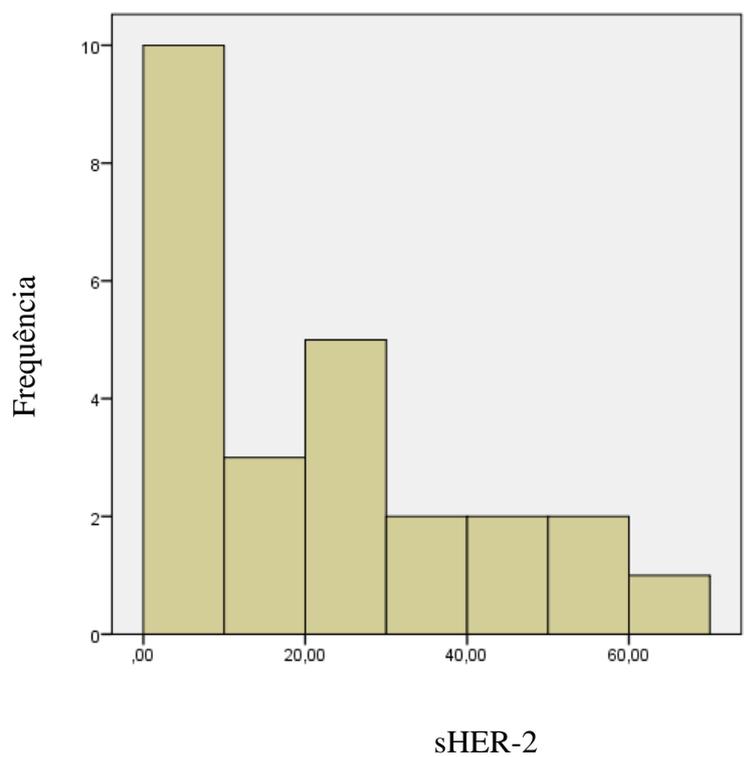


Gráfico 10 – Níveis de sHER-2 dos pacientes com tumores incluídos na categoria T1.

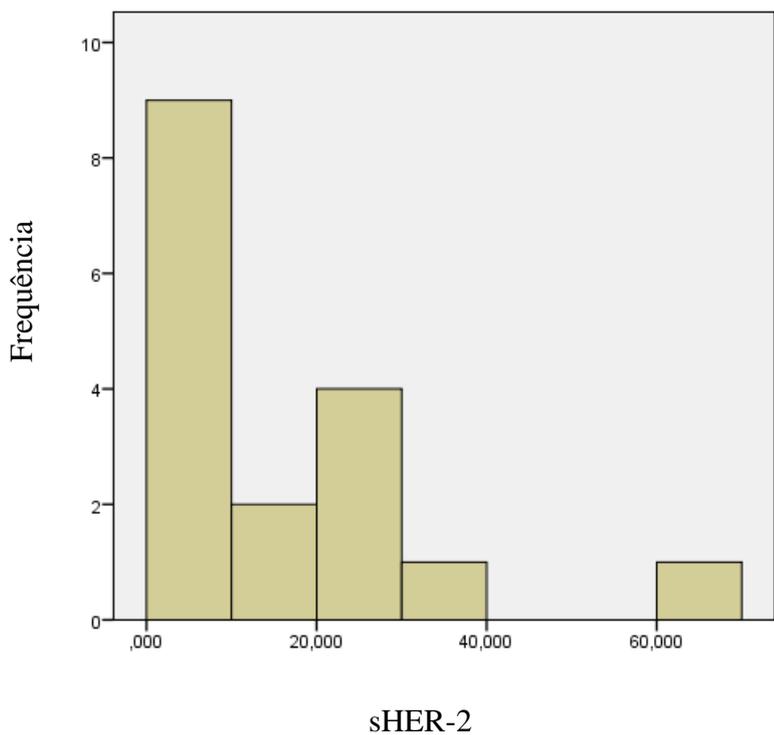


Gráfico 11 – Níveis de sHER-2 dos pacientes com tumores incluídos na categoria T2.

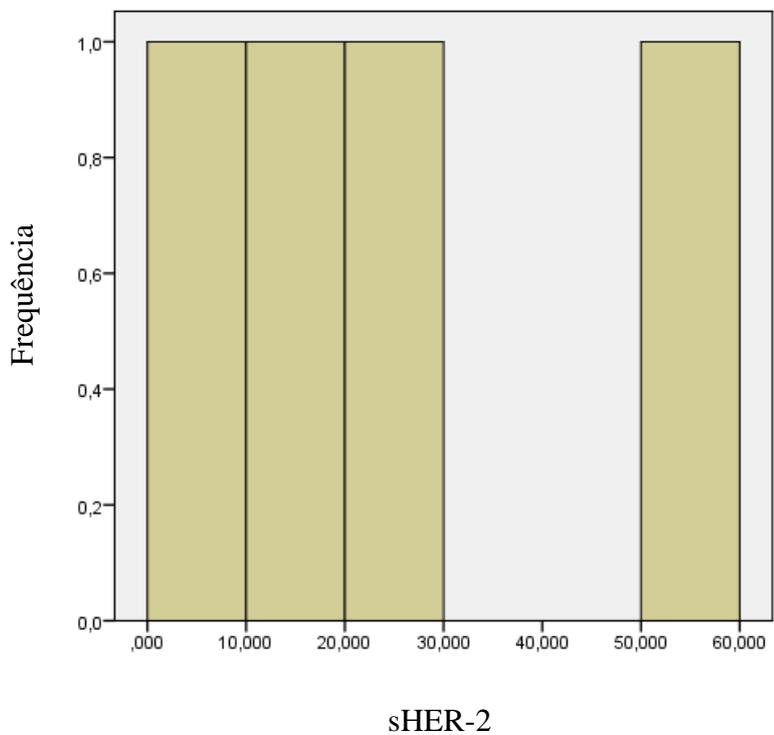


Gráfico 12 – Níveis de sHER-2 dos pacientes com tumores incluídos na categoria T3.

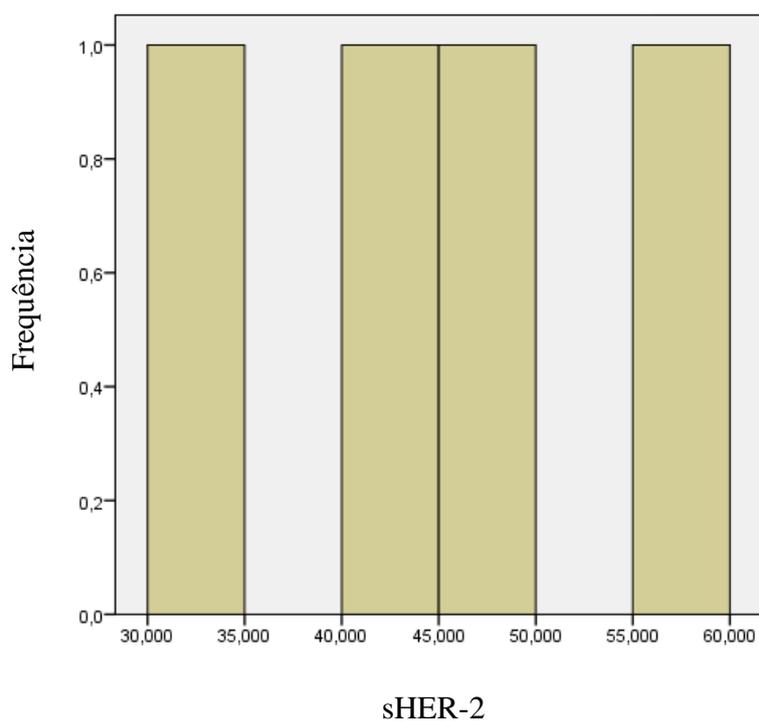


Gráfico 13 – Tamanhos de todos os tumores extirpados (N = 35).

