



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

VALOR PROGNÓSTICO DE CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS E
IMUNOFENOTÍPICAS EM TUMORES MAMÁRIOS CANINOS

ANGELINA GONÇALVES PEDROSA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Maria da Conceição Cunha
e Vasconcelos Peleteiro

Doutor Fernando António da Costa Ferreira

Doutora Solange Alves Gil

ORIENTADOR

Doutor Fernando António da Costa Ferreira

COORIENTADOR

Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia

2016

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

VALOR PROGNÓSTICO DE CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS E
IMUNOFENOTÍPICAS EM TUMORES MAMÁRIOS CANINOS

ANGELINA GONÇALVES PEDROSA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Maria da Conceição Cunha
e Vasconcelos Peleteiro

Doutor Fernando António da Costa Ferreira
Doutora Solange Alves Gil

ORIENTADOR

Doutor Fernando António da Costa Ferreira

COORIENTADOR

Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia

2016

LISBOA

Aos meus pais, Maria do Céu e Joaquim,
Professores maiores do Amor, da força, da generosidade e da beleza.

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood.
Now is the time to understand more, so that we may fear less.”
Marie Curie

“Não se almeje a possibilidade de ser compreendido
antes a impossibilidade de ser incompreendido.”
Marcus Fabius Quintilianus

“Any knowledge that doesn’t lead to new questions quickly dies out:
it fails to maintain the temperature required for sustaining life.”
Wisława Szymborska

“The woods are lovely, dark and deep,
But I have promises to keep,
And miles to go before I sleep,
And miles to go before I sleep.”
Robert Frost

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Fernando Ferreira que, desde o primeiro ano do meu percurso académico nesta instituição, se mostrou absolutamente disponível para me formar o melhor possível como profissional, deixando-se ver-me como pessoa, à luz dos meus vários contextos e particularidades. Por sempre me ter deixado todas as portas abertas, por sempre ter impedido que se fechassem. Por me dar liberdade e autonomia totais quando sentiu haver em mim força, motivação e determinação, por não deixar de me pressionar quando me sentiu fraquejar- para que eu própria não me deixasse permitir essa fraqueza. Por me ter dado a oportunidade de entrar num grupo de trabalho que me apaixonou científica e pessoalmente, e que será de longe a minha experiência académica mais bonita e marcante.

Ao Professor Doutor Jorge Correia pela disponibilidade em relação a tudo o que se relacionasse com o meu trabalho, o que se revelou em muitas muitas horas de muitos meses de mais de um ano de trabalho ombro a ombro (literalmente – ao multiocular- e nem tanto), a custo de muitas horas do seu próprio trabalho e da sua vida pessoal. Pela paciência, pela generosidade, pelos ensinamentos a tantos níveis, pelo carinho, pela amizade. Infinitamente grata e com um sentido de privilégio muito grande por tudo o que este contacto continuado me trouxe, para a vida.

À Dra. Maria João Soares, minha companheira constante neste trabalho, também minha mentora. Esta Universidade será para sempre recordada luminosa, com a vista de rio, a perspectiva de ponte e o som de um riso generoso e contagiante algures, por ela a ter feito assim. Por me ter ensinado a utilizar os meus recursos e os meus sentidos, cientificamente. Por me ter dado oportunidade de aprender com a sua admirável forma de trabalhar e viver. Por ter feito das minhas necessidades sua prioridade, sempre. Por tudo o que me ensinou de equanimidade, como profissional e como pessoa. À Dra. Margarida Simões, sempre pronta a encontrar soluções para qualquer problema, de uma generosidade, conhecimento e espírito sempre inspiradores

À Prof.^a Dra. Renée L. Amorim, que me surpreendeu desde o primeiro contacto pela celeridade e informalidade de resposta ao meu pedido de informações e que, com um altruísmo desarmante, se prontificou a resolver-me um problema, suportando custos e disponibilizando os seus recursos, apenas por ter reconhecido e valorizado uma motivação. Encontro dificuldades para expressar a minha admiração por uma pessoa que congrega tantas das qualidades que mais me são basilares na constituição da admiração e do respeito. Agradeço-lhe a capacidade de ser tão grande com tamanha simplicidade.

À Dra. Sandra Carvalho, pelas tantas horas dedicadas exclusivamente ao meu trabalho e pela disponibilidade em partilhar de conhecimentos técnicos tão consistentes. Pelo que me ensinaram a competência e rigor com que pauta o seu trabalho. À D. Maria do Rosário, D. Maria Augusta e D. Manuela por estarem sempre disponíveis para ajudar, pelo que me ensinaram, a liberdade que me deram, e por me fazerem sempre sentir parte da *sua* casa.

A todos os médicos veterinários que aceitaram participar deste estudo disponibilizando as amostras e as informações, concretamente os corpos clínicos da Clínica Veterinária Dra. Elsa Pereira, Clínica Veterinária Vetemouras, Clínica do Anjo e Clínica Veterinária de Sintra. O meu especial agradecimento ao Dr. Rodrigo Bom, incansável na tentativa de resolução de qualquer dificuldade ou na obtenção do que me fosse necessário ao trabalho, bem como pela imensurável amizade, pela qual sinto que estarei eternamente em dívida.

À Dra. Ana Murta que, com o Dr. Rodrigo, me permitiu obter a maior parte das amostras. Agradeço aos dois a paciência, a disponibilidade, a boa disposição e o cuidado em me fazerem

chegar às mãos aquilo de que eu necessitava da forma mais expedita possível, com um evidente respeito pelo meu trabalho.

Aos donos de todas as cadelinhas que me permitiram fazer o seguimento dos casos e que foram, sem exceção e, sendo o que motivava os contactos tão potencialmente doloroso, de enorme disponibilidade e simpatia.

Ao Dr. Nuno Félix e ao Dr. Gonçalo Vicente, meus guias e orientadores na componente de estágio em ambiente hospitalar. Pela disponibilidade, pela abertura, pelo esforço em participar da minha formação de uma forma ativa. A todos os médicos, enfermeiros, auxiliares e administrativos do Hospital Veterinário da FMV que me permitiram conhecer uma realidade de trabalho tão nobre, com tanto profissionalismo e com tanto cuidado. Que me permitiram sentir parte de uma equipa da qual me orgulhei, pelo conjunto e por cada um deles, individualmente. A minha qualidade como futura veterinária terá muito a dever, além de a cada um dos médicos, a cada um dos enfermeiros e assistentes que foram incansáveis a ensinar-me a arte (ou os truques) que só conhece quem com ela está muito familiarizada, e que faz toda a diferença. Aos meus colegas de estágio pelo companheirismo, constante espírito de entreajuda e partilha de conhecimento e experiências.

Ao Octávio, à Susana e à Andreia, meus tão preciosos amigos ao longo deste curso e da minha vida- Por terem feito de um percurso académico tortuoso e tão abundante em obstáculos uma experiência que recorro como sempre amparada. Por todo o crescimento que me permitiram antes e continuam a permitir.

À minha Rita. Ao Fininho, à Bambina e ao Twiggy, que me ensinaram tanto amor.

Ao Fábio.

À minha irmã e Jorge, pela generosidade e carinho com quem me acolheram.

Aos meus pais, pela inamovível e contagiante fé em mim e por toda a força.

VALOR PROGNÓSTICO DE CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS E IMUNOFENOTÍPICAS EM TUMORES MAMÁRIOS CANINOS

Resumo

À semelhança do que é a realidade no universo da Medicina humana, a identificação de parâmetros relevantes a nível de prognóstico constitui uma área de investimento considerável na investigação do cancro mamário canino. Este trabalho pretende caracterizar tumores mamários caninos quanto às características epidemiológicas, clinicopatológicas e imunofenotípicas, avaliando o seu valor prognóstico pela investigação de associações significativas ou tendenciais entre si e incluindo as que dizem respeito aos estudos de sobrevivência [análise do tempo de sobrevivência (TS) e do tempo livre de doença (TLD)]. Pretende verificar também, em termos temporais concretos, como as diferenças em cada uma das características se traduz em termos de prognóstico. Os dados foram obtidos a partir de uma amostra de 41 cadelas que apresentavam tumores mamários. Os tumores foram analisados por avaliação histopatológica, pela avaliação da expressão de marcadores moleculares (Ki-67, RP, HER-2 e CK5/6) através de técnica imunohistoquímica e pelo estabelecimento de sua respetiva classificação molecular. Em termos epidemiológicos a nossa amostra mostrou-se perfeitamente concordante com a descrita em estudos anteriores. Em termos associativos foi possível concluir, a nível estatisticamente significativo, do pior prognóstico do maior tamanho tumoral, da metastização regional, do maior estadio tumoral TNM, da infiltração de células linfocíticas, dos tipos histopatológicos considerados de maior malignidade, do maior grau histológico de malignidade e da ausência de diferenciação mesenquimatosa. A expressão de Ki-67 como indicador de proliferação revelou-se de valor prognóstico importante, pela associação (estatisticamente significativa) da sua maior expressão às características anteriormente descritas como indicativas de pior prognóstico em si: o tamanho tumoral, o grau de malignidade, a necrose intratumoral, a metastização regional e, em termos epidemiológicos, a cadelas de raça indeterminada. O valor *cut-off* de 25% para o Ki-67 surgiu como o mais apropriado para o estudo do seu valor prognóstico (quando comparado com os *cut-off* alternativos de 20% e 16,43%-mediana) pelo número e significância de associações conseguidas. A maior expressão de RP surgiu associada significativamente aos tumores de cadelas inteiras e cadelas de raça indeterminada, assim como a tumores de tipo histológico simples e complexos e graus I e II de malignidade. Verificou-se uma sobre-expressão do marcador HER-2 em 19,4% dos tumores analisados, com uma maior frequência destes em carcinomas simples e de grau histológico III

com infiltração linfocítica, não se chegando no entanto a associações estatisticamente significativas. As CK5/6 tiveram expressão positiva quase ubiquitária, sendo os carcinomas de células escamosas o tipo histológico com uma maior percentagem de marcação.

Dentro das associações estatisticamente significativas, no que diz respeito aos subtipos moleculares de acordo com o sistema de classificação adotado, os tipos Luminal A e B foram associados às cadelas de raça indeterminada, verificando-se uma maior significância quando considerado apenas o subtipo Luminal B. Este subtipo foi também associado à ocorrência de metastização. O subtipo Basal foi associado (quase significativamente) às cadelas previamente submetidas a OVH e, significativamente, a carcinomas de células escamosas. Os estudos de sobrevivência vieram, por análise dos diferenciais de tempo dos TS e TLD, corroborar as indicações fornecidas pelas associações. A nível significativo apenas o tamanho tumoral se revelou como indubitável fator de prognóstico para TS e TLD, e apenas considerando o *cut-off* de 3 cm. A nível quase significativo, foram validados como fatores de prognóstico de TS a classificação histopatológica (carcinomas simples/complexos), a infiltração linfóide, a metastização regional, o estadiamento TNM (I+II/III+IV) e o Ki-67 (*cut-off* de 25%) e como fatores de prognóstico do TLD a infiltração celular linfóide e a OVH simultânea à mastectomia. Quanto aos subtipos moleculares, o subtipo molecular HER-2 positivo apresentou sempre o pior prognóstico, sendo bastante aproximado do subtipo Basal, sendo os melhores prognósticos apresentados pelos subtipos moleculares Luminais. Os subtipos Luminais A e B apresentaram TS e TLD muito aproximados. Não se verificou conservação de características imunofenotípicas e, conseqüentemente, de subtipo molecular, dos tumores considerados primários para as suas metástases. Dadas as dificuldades encontradas na elaboração deste trabalho concluiu-se ser essencial a criação de *guidelines* mais detalhadas concernentes a todos os processos envolvidos no estudo da patologia desta afeção na espécie canina em particular.

Palavras-chave: Tumores mamários caninos, prognóstico, caracterização clinicopatológica e imunofenotípica, estudo associativo, TS e TLD, estandardização de metodologias e critérios

PROGNOSTIC VALUE OF CLINICOPATHOLOGIC AND IMMUNOPHENOTYPIC FEATURES IN CANINE MAMMARY TUMOURS

Abstract

As in human medicine, the identification of relevant prognostic parameters constitutes a vast area of considerable investment in the canine mammary cancer study. This work intends the characterization of canine mammary tumors concerning the epidemiological, clinicopathologic and immunophenotypic characteristics, evaluating their prognostic value by the investigation of significative associations and tendencies between them and including the ones that concern the survival studies [overall survival (OS) and disease free survival (DFS)]. Furthermore, it aims to verify, in concrete temporal terms, how the differences in each characteristic translate in prognostic terms. The data were gathered from a sample of 41 bitches presenting mammary tumours. The tumors were analysed by histopathologic evaluation, the immunohistochemical expression of molecular markers (Ki-67, PR, HER-2 e CK5/6) and according to the respective molecular classification. Epidemiologically, our sample has proved to be perfectly accordant with previous studies. Considering the correlation studies, we were able to conclude, in a significant level, of the worse prognosis of the larger tumor size, the regional metastasis, the higher TNM stage, the lymphocitic infiltration, the histologic tumor types considered of higher malignancy, the higher histologic grade and the absence of mesenchimal differentiation. Ki-67 as the proliferation indicator has revealed itself of important prognostic marker, as its higher rate correlated (on a significant level) with the previously described characteristics of worse prognosis: tumour size, malignancy grade, intratumoral necrosis, regional metastasis and, epidemiologically, mixed breed bitches. The cut off value of 25% for Ki-67 stood up as the most appropriate to study its prognostic value (when compared with the 20% and 16,43% - median- alternative cut-offs) by the significance of associations. The biggest expression of PR was significantly associated to the tumors of bitches of mixed breed and not sterilized, also as to simple and complex carcinomas and histological grades I and II. There was a HER-2 overexpression in 19,4% of the analysed tumors and there were several tendencies verified, such as a higher frequency in simple carcinomas, grade III carcinomas and lymphocitic infiltration, even though we couldn't find any significant correlations. Citokeratins 5/6 had an almost ubiquitous expression, with squamous cells carcinomas being the ones with the highest percentage of marked cells. Considering the molecular subtypes, according to the adopted classification system, the Luminal A and B were correlated with mixed breed bitches, with an

increase of the significance level when considered the Luminal B subtype alone. This subtype was also correlated with the occurrence of regional metastization. Basal subtype was correlated (almost significantly) with ovariectomized bitches and, significantly, to scamous cells carcinomas. Considering the survival studies, on a statistical significant level, only the tumour size was undoubtedly revealed as prognostic factor for OS and DFS, and only when considered the 3 cm cut-off. On a statistical significant level, histopathological classification (simple/complex carcinomas), lymphocitic infiltration, regional metastization, TNM staging (I+II/III+IV) and Ki-67 (25% cut-off) were validated as OS prognostic factors. As for DFS, only lymphocitic infiltration and OVH simultaneous to mastectomy were found. As regards for the molecular classification, the HER-2 overexpression subtype presented the worst prognosis, both in OS and DFS, being quite close to the Basal subtype. The best prognosis were presented by the Luminal subtypes which were, between them (Luminal A and B) very similar in OS and DFS. We didn't observe any conservation of immunophenotypic traits or molecular subtypes from the primary tumour to its metastasis. Given the difficulties found in the elaboration of this work, we consider as essential the existence of more detailed guidelines concerning the processes involved in the study of the pathology of this disease in this particular species.

Key-words: Canine mammary tumors, prognosis, clinicopathological and immunophenotypical characterization, correlation studies, OS and DFS, standardization of methodologies and criteria, specificity.

Índice geral

Dedicatória	i
Citações	iii
Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Índice geral	xi
Índice de figuras	xiv
Índice de tabelas	xiv
Lista de abreviaturas	xiv

Capítulo I – Descrição sumária de atividades realizadas no âmbito do estágio curricular

1

Capítulo II – Revisão bibliográfica	2
II 1. Cancro- uma doença dos “tempos modernos”?	2
II 2. Importância dos modelos animais na Oncologia Comparada	3
II 3. A glândula mamária	5
II 3.1 Enquadramento histórico e importância	5
II 3.2 Anatomia	6
II 3.3 Sistema de drenagem linfática e circulação sanguínea	6
II 3.4 Histologia	7
II 4. Carcinogénese	8
II 5. Apresentação clínica	10
II 6. Diagnóstico	11
II 6.1 Estadiamento TMN	13
II 6.2 Avaliação histopatológica	14
II 6.2.1 Classificação histológica	14
II 6.2.2 Atribuição do grau de malignidade	14
II 6.3. Classificação molecular	16
II 7. Epidemiologia e causas oncogénicas/fatores de risco	16
II 7.1 <i>Continuum</i> histológico entre benignidade e malignidade	16
II 7.2 Incidência	17
II 7.3 Idade	18
II 7.4 Sexo	19
II 7.5 Raça e predisposição genética	19
II 7.6. Localização	21
II 7.7 Hormonas e fatores de crescimento	21
II 7.8 Expressão da Ciclooxygenase-2	24
II 7.9 Dieta	24
II 7.10 Vírus	25
II 8. Prognóstico	25
II 8.1 Tamanho tumoral	26
II 8.2 Tipo histológico	26
II 8.3 Grau histológico	27
II 8.4 Metastização regional e à distância	28
II 8.5 Idade	28
II 8.6 OVH simultânea à cirurgia	28
II 8.7 Infiltração celular linfoide	28
II 8.8 Necrose intratumoral	30

II 8.9 Diferenciação mesenquimatosa	30
II 8.10 Marcadores tumorais	32
II 8.10.1 Marcadores de proliferação	33
II 8.10.1.1 PCNA	33
II 8.10.1.2 Ki-67	33
II 8.10.1.3 AGNOR	35
II 8.10.1.4 Índice mitótico	35
II 8.10.2 Recetores hormonais esteroides- RE e RP	35
II 8.10.3 Marcadores basais – Citoqueratinas 5/6	39
II 8.10.4 Família EGFR	44
II 8.10.4.1 HER-2	44
II 8.10.4.2 HER-1	47
II 8.11 <i>BRCA1/BRCA2, p53 e p63</i>	48
II 8.12 Cox-2	49
II 8.13 Subtipos moleculares- Uma nova classificação	50
II 8.13.1 Classificação molecular na mulher	50
II 8.13.1.1 Subtipificação molecular moderna	57
II 8.13.2 Classificação molecular na Cadela	58
II 9. Tratamento	62
II 9.1 Cirurgia	62
II 9.2 Tratamento sistémico	63
II 9.2.1 Na mulher	63
II 9.2.2 Na cadela	64
II 9.2.2.1 Terapias hormonais	64
II 9.2.2.2 Quimioterapia	65
II 9.2.2.3 Terapia anti-HER-2	66
II 9.2.2.4 Outros tipos de tratamento	67
II 9.2.2.4.1 Desmopressina	67
II 9.2.2.4.2 Inibidores da Cox-2	67
II 9.3 Radioterapia	68
Capítulo III – Objetivos	69
Capítulo IV – Material e Métodos	70
IV 1. Amostragem	70
IV 1.1 Recolha e processamento de amostras	70
IV 1.2 Seleção das amostras	71
IV 1.3 Critérios de inclusão e exclusão no estudo	71
IV 2. Estudo prospetivo e de seguimento	72
IV 3. Imunohistoquímica	73
IV 3.1 Seleção de fragmentos para análise	73
IV 3.2 Descrição e especificidades da técnica imunohistoquímica	74
IV 3.3 Avaliação imunohistoquímica	76
IV 3.3.1 HER-2	76
IV 3.3.2 Citoqueratinas 5/6	77
IV 3.3.3 Ki-67	77
IV 3.3.4 Recetores de estrogénio e progesterona	78
IV 4. Classificação molecular	79
IV 5. Análise estatística	80
IV 5.1 Associação de variáveis por análise univariada	80
IV 5.2 Análise univariada por curvas de Kaplan-Meier	82

Capítulo V – Resultados	83
V 1. Dados descritivos	83
V 1.1 Variáveis clinicopatológicas	83
V 1.1.1 Estudo de casos	83
V 1.1.2 Estudo de tumores	84
V 2. Análise estatística	87
V 2.1 Análise univariada - Associação entre variáveis	87
V 2.1.1 Variáveis clínicas e histopatológicas	87
V 2.1.1.1 Estudo de casos	87
V 2.1.1.2 Estudo de tumores	88
V 2.1.2 Marcadores moleculares	89
V 2.1.2.1 Avaliação da expressão de Ki-67	90
V 2.1.2.2 Avaliação da expressão de RP	94
V 2.1.2.3 Avaliação da expressão de HER-2	95
V 2.1.2.4 Avaliação da expressão de CK5/6	97
V 2.1.3 Classificação molecular	99
V 2.1.3.1 Estudo de casos	99
V 2.1.3.2 Estudo de tumores	99
V 2.1.4 Metástases	101
V 2.2 Análise de tempo de sobrevivência e tempo livre de doença	102
V 2.2.1 Análise Univariada- Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier .	102
V 2.2.1.1 Tempo de sobrevivência (TS)	102
V 2.2.1.2 Tempo livre de doença (TLD)	105
Capítulo VI – Discussão	108
VI 1. Caracterização tumoral e estudo de prognóstico de acordo com variáveis epidemiológicas e clinicopatológicas	108
VI 1.1 Estudo descritivo	108
VI 1.2 Estudo associativo	110
VI 2. Caracterização de metástases	114
VI 3. Caracterização tumoral e estudo de prognóstico de acordo com imunexpressão molecular de marcadores moleculares	114
VI 3.1 Ki-67	114
VI 3.2 RP	119
VI 3.3 HER-2	123
VI 3.4 CK5/6	126
VI 4. Caracterização tumoral e estudo de prognóstico de acordo com classificação molecular	128
Capítulo VII – Conclusões	132
Capítulo VIII- Bibliografia	136
Capítulo IX- Anexos	167
Anexo A- Inquérito entregue a clínicas e hospitais veterinários que se disponibilizaram para a recolha e entrega de amostras tumorais mamárias e amostras de sangue.	167
Anexo B- Base protocolar de técnicas imunohistoquímicas realizadas com resultados satisfatórios.	168
Anexo C- Protocolos utilizados na tentativa de deteção de imunexpressão para RE nas instalações da FMV.	170

Anexo D- Descrição do protocolo usado pela equipa da Prof. ^a Dra. Renée L. Amorim (Unesp, Brasil) na realização de IHQ para deteção da imunoexpressão para RE.	171
Anexo E- Curvas de Kaplan-Meier de tempo de sobrevivência para variáveis com valores de p mais significativos, marcadores moleculares e classificação molecular.	172
Anexo F- Curvas de Kaplan-Meier de tempo livre de doença para variáveis com valores de p mais significativos, marcadores moleculares e classificação molecular.	175
Anexo G- Certificados de participação em comunicações livres no X Congresso do Hospital Veterinário Montenegro, 2014.	177

Índice de figuras

Figura 1- Representação esquemática da classificação molecular usada neste trabalho (adaptada de ORPHEO, 2014).	79
Figura 2- Exemplos de marcação positiva para Ki-67 em tecidos tumorais mamários de cadela.	93
Figura 3- Exemplos de marcação ou ausência para RP em tecidos tumorais mamários de cadela.	95
Figura 4- Exemplos de marcação para HER-2 em tecidos tumorais mamários de cadela.....	96
Figura 5- Exemplos de marcação positiva para CK5/6 em tecidos tumorais mamários de cadela.	98

Índice de tabelas

Tabela 1- Estadiamento clínico (TNM) de tumores mamários caninos (adaptado de Sorenmo et al., 2013).	13
Tabela 2- Critérios para avaliação de grau histológico de malignidade (adaptado de Clemente et al., (2010a) e Peña et al. (2013).	15
Tabela 3- Especificidades dos protocolos para a deteção dos diferentes marcadores moleculares.	75
Tabela 4- Caracterização dos anticorpos primários utilizados e particularidades de utilização	75
Tabela 5- Critérios interpretativos para imunohistoquímica (IHQ) de HER-2 em tumores mamários caninos (adaptado de Peña et al., 2014).	76
Tabela 6- Variáveis clínicas e anatomopatológicas: distribuição por casos e tumores.	86
Tabela 7- Distribuição do índice de Ki-67 por variáveis clinicopatológicas de acordo com diferentes <i>cut-off</i> considerados.	91
Tabela 8- Distribuição de imunomarcação para RP, HER-2 e CK5/6 por variáveis clinicopatológicas.	98
Tabela 9- Distribuição de Classificação Molecular por variáveis clinicopatológicas.	100
Tabela 10- Comparação de parâmetros moleculares entre tumores mamários primários e suas metástases em cadelas.	101
Tabela 11- Resumo de valores de prova, de TS e TLD para as variáveis analisadas	107

Lista de abreviaturas

17 β -estradiol – 17 <i>beta</i> -estradiol
ADN - ácido desoxirribonucleico
ADNc - ácido desoxirribonucleico complementar
AGNOR – regiões organizadores nucleolares argirofílicas
AKT – proteína quinase B PI3K-PKB
ARN – ácido ribonucleico
ARNm – ácido ribonucleico do tipo mensageiro
ASCO – <i>American society of Clinical Oncology</i>
Bcl-2 – proteína linfoma de células B 2
BRCA1 – <i>breast cancer type 1 protein</i>

BRCA1 – breast cancer type 1 gene
BRCA-2 – breast cancer type 2 protein
BRCA-2 – breast cancer type 2 gene
 CD10 – antígeno CD10
 CD3 – antígeno CD3
 CD44 – antígeno CD44
 CIISA – Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal
 CISH – hibridização cromogénica *in situ*
 CK – citoqueratinas
 COX-1 – ciclooxigenase-1
 COX-2 – ciclooxigenase-2
 DAB – 3,3' - diaminobenzidina tetrahidroclorato
 DGS – Direção Geral de Saúde
 EDTA – ácido etilenodiaminotetraacético
 EGFR – recetor do fator de crescimento epidérmico
 ERK – quinase regulada extracelular
ESR1 – gene que codifica o RE- α
ESR2 – gene que codifica o RE- β
 EUA – Estados Unidos da América
 FDA – *Food and Drug Administration*
 FMV – Faculdade de Medicina Veterinária
FOXA1 – forkhead box protein A1 transcription factor
 G0 – fase quiescente do ciclo celular
 G1 – fase de pré-síntese de ADN do ciclo celular
 G2 – fase pré-mitótica do ciclo celular
GATA3 – fator de transcrição transativo específico de células T
 GH – hormona de crescimento
 GHR – recetor de GH
GrB7 – fator de transcrição da proteína 7 ligada ao recetor de fator de crescimento
 HE – hematoxilina-eosina
 HER-1 - EGFR – recetor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 1
 HER-2- – HER-2 negativo
 HER-2, ErbB-2 – recetor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2
 HER-2 positivo – subtipo tumoral com sobre-expressão de HER-2 ou tumor com *score* 3
 HER-2+ – subtipo tumoral com sobre-expressão de HER-2
HER-2/neu – gene que codifica o HER-2
 HER-3 – recetor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 3
 HER-4 – recetor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 4
 HPF – *high power field*
 IARC – *International Agency for Research on Cancer*
 IGF-I – fator de crescimento semelhante à insulina tipo I
 IHQ – imunohistoquímica
 Ki-67 – marcador de proliferação celular Ki-67
 M – fase mitótica do ciclo celular ou metástase à distância
MAP3K1 – fator de transcrição da proteína ativada por mitogénio 3-quinase 1
MAPK – fator de transcrição da proteína quinase ativada por mitogénio
MAPK – proteína quinase ativada por mitogénio
MED1 – fator de transcrição do mediador da polimerase II do ARN transcricional da subunidade 1
MED24 – fator de transcrição do mediador da polimerase II do ARN transcricional da subunidade 24
MKI67 – gene que codifica a proteína Ki-67

MMTV – homólogo do vírus do tumor mamário dos murinos
N – linfonodo regional
n – número
OMS – Organização Mundial de Saúde
OVH – ovariectomia
p – valor de prova
p53 – gene supressor de tumores que codifica a proteína tumoral 53
p53 – proteína tumoral 53
PA – *progesteron antagonists*
PAAF – punção aspirativa com agulha fina
PAM50 (*Prediction of Microarray 50 genes*)
PBS – tampão fosfato salino
PCNA – antígeno nuclear de proliferação celular
PCR – *Polimerase Chain Reaction*
PI3K – fosfoinositido 3-quinase
PI3KCA – fator de transcrição do fosfatidilinositol-3-quinase polipeptídeo catalítico *alfa*
PKC – proteína quinase C
PLC γ – fosfolipase C γ
PRM – *progesterone receptor modulator*
RE – recetor de estrogénio
RE- – RE- α negativo
RE- β – recetor de estrogénio *beta*
RE+ – RE positivo
RE- α – recetor de estrogénio *alfa*
RP – recetor de progesterona
RP- – RP negativo
RP+ – RP positivo
RTK – recetores tirosina-quinases
RTU – *ready to use*
S – fase de síntese do ciclo celular
SMA- α – *smooth muscle actin- α*
S100 - proteína S100
T – tamanho do tumor
T1 – tumor < 3 cm
T2 – tumor de tamanho entre 3-5 cm
T3- tumor > 5 cm
TBS – *tris buffered saline*
TLD – tempo livre de doença
TMC – tumores mamários caninos
TRIS – tris(hidroximetil)aminometano
TS – tempo de sobrevivência
ULTD – unidades lobulares terminais ductais
VEGF – fator de crescimento do endotélio vascular
XBPI- *X-box binding protein 1 transcription factor*

Capítulo I - Descrição sumária de atividades realizadas no âmbito do estágio curricular.

O estágio curricular que teve como concretização final a elaboração da presente dissertação para a finalização do currículo do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária foi dividido num estágio de natureza profissional e num estágio em atividades de investigação.

A primeira parte constou de um estágio em ambiente hospitalar veterinário, tendo sido realizado nas instalações do Hospital Escolar Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, sob orientação do Dr. Nuno Félix e coorientação do Dr. Gonçalo Vicente. Este estágio decorreu entre setembro de 2012 e março de 2013. Como estagiária no contexto da prática clínica a aluna participou de todas as atividades que a esta dizem respeito, com maior ou menor autonomia em funções de acordo com o desenvolvimento das suas competências e experiência. Como tal, as suas atividades, de forma escalonada e rotativa, foram desenvolvidas no âmbito da Medicina Interna, Cirurgia, Imagiologia e Internamento. A segunda parte do estágio curricular, relacionada com atividades de investigação, foi desenvolvida entre março de 2013 e dezembro de 2013, havendo a somar meses de trabalho realizado de forma mais ou menos descontínua até julho de 2015, no Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, sob orientação do Professor Doutor Fernando Ferreira e coorientação do Professor Doutor Jorge Correia. De assinalar neste sentido também a superlativa colaboração da Dr.^a Maria João Soares, doutoranda com um plano de trabalhos relacionado com a análise molecular de carcinomas mamários felinos. Numa primeira fase, adicionalmente aos objetivos definidos na presente dissertação, desejou-se descrever e otimizar a técnica de *Dot-Blot* para a quantificação do domínio extracelular do oncogene HER-2 no soro de cadelas com carcinomas mamários e proceder à associação com a sua expressão nos tecidos tumorais pelo que, além da recolha de amostras teciduais, foi feita a recolha de amostras de sangue e alinhavada uma estratégia para esse projeto. Esta componente adicional acabou por se revelar algo ambiciosa, sendo posteriormente abandonada e disponibilizando-se o material para estudos subsequentes. A descrição das atividades relacionadas com o corrente projeto encontram-se descritas no Capítulo V- Material e Métodos. Finalmente, a aluna disponibilizou-se para a monitorização dos momentos cirúrgicos efetuados no supracitado Hospital Escolar para assistir o Prof. Doutor Jorge Correia na recolha de amostras tumorais mamárias, obtidas no momento temporal exato da extirpação das mesmas, no contexto da colaboração no trabalho de doutoramento do Dr. Luís R. Raposo (Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa e Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa).

Capítulo II – Revisão Bibliográfica

II 1. Cancro: uma doença dos “tempos modernos”?

O cancro pode ser tendencialmente pensado como uma doença dos tempos “modernos”, parecendo pertencer à contemporaneidade o maior número de casos diagnosticados. No entanto, a ideia de exclusiva modernidade desta doença ou da sua exponencialidade de crescimento pode ser algo falaciosa se extremada, não sendo difícil de desconstruir se atendermos a dois factos. Primeiro, que o cancro, aliado às doenças cardiovasculares, é de facto uma das maiores causas de mortalidade em idades mais avançadas. Convém lembrar que foi apenas durante as últimas décadas do século XIX que uma grande proporção da população mundial viu a sua esperança média de vida superar os 40 anos. Numa época áurea em termos de desenvolvimento no âmbito das ciências da saúde, esta alteração deveu-se, em larga medida, à descoberta da cura ou ao controlo de um grande número de doenças então muito prevalentes e fatais (*International Agency for Research on Cancer [IARC], 2008; Rayter & Mansi, 2008*). O aumento da esperança média de vida surge como elemento “catalisador” para o aparecimento de casos oncológicos. Segundo, os constantes desenvolvimentos na medicina e nas ciências complementares, bem como nos meios de diagnóstico (particularmente imagiológicos), permitiram, além de um contínuo aumento da esperança média de vida, um aumento do reconhecimento das doenças oncológicas que anteriormente não seriam identificadas como tal ou mais facilmente passariam despercebidas.

Partindo desta base de conhecimento e da consciência de um incremento “natural” no aparecimento de casos oncológicos na atualidade, a verdade é que, não obstante, existe *realmente* um indubitável aumento da incidência de cancro, o que se julga decorrente do aumento da exposição a agentes carcinogénicos (IARC, 2008). Como dados epidemiológicos mais recentes disponibilizados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) temos os constantes no *World Cancer Report (2014)*, compilados pela IARC. Neste documento, o cancro consta como uma das maiores causas de mortalidade a nível mundial, havendo para o ano de 2012 a contabilização aproximada de 14 milhões de novos casos e de 8.2 milhões de mortes. Para as próximas duas décadas é expectável um aumento de novos casos em 70%. Mais de 60% de novos casos anuais e 70% das mortes são relativas a ocorrências em África, Ásia, América Central e do Sul. As neoplasias mais frequentemente diagnosticadas, de acordo com estes dados, são as de cancro de mama na mulher e cancro pulmonar no homem sendo, tanto nos

países em desenvolvimento como nos desenvolvidos, os responsáveis pelo maior número de mortes, para os dois sexos.

No âmbito da realidade nacional, de acordo com o Programa Nacional para as Doenças Oncológicas de 2013, da Direção Geral de Saúde (DGS), “na União Europeia, a previsão realizada pela IARC, e tendo como base apenas o envelhecimento da população, determina um aumento dos novos casos de cancro em 13,7%. As previsões para Portugal são semelhantes e apontam para um acréscimo de 12,6%” (DGS, 2013, p.5). Por outro lado, torna-se também evidente o crescimento, paralelo ao da população envelhecida, de uma nova população, em tudo devido ao empenho dos profissionais de saúde e ao desenvolvimento do conhecimento científico: os sobreviventes de cancro.

Destinando-se esta monografia a uma caracterização das neoplasias mamárias na espécie canina, parece essencial referir que o conhecimento que existe neste momento em relação a esta afeção nesta espécie se deve em muito ao entrosamento de informações oriundas de estudos realizados no âmbito oncológico para a espécie humana. São a enorme prevalência desta doença e as suas características de morbilidade e mortalidade nos humanos que justificam as avultadas somas globalmente direcionadas a este ramo da investigação e que nos permitem, por sua vez, chegar aos mais importantes pontos de partida para o estudo nas espécies domésticas. Pode-se mesmo dizer que o paralelismo, cada vez mais evidente, que existe entre o conhecimento de tumores mamários humanos e caninos/felinos se deve largamente às necessidades da Oncologia Comparada em modelos animais, e a utilização destas espécies como tal. Por outro lado, cada vez mais no contexto da Medicina Veterinária, os donos exigem para os seus animais que os prestadores de saúde que procuram sejam detentores de um nível de conhecimento científico profundo, equiparável aos que encontram na saúde humana (Peleteiro, 1994), mantendo as expectativas de tratamento possível também ao mesmo nível.

II 2. Importância dos modelos animais na Oncologia Comparada

O cancro resulta de um processo biológico complexo cuja compreensão beneficia da elaboração de modelos experimentais. Assistiu-se, em Oncologia, ao desenvolvimento desses modelos de estudo, de mais simples para progressivamente mais complexos, através do uso de numerosos modelos animais (Peleteiro & Correia, 1993b; Pinho, Carvalho, Cabral, Reis & Gartner, 2012). Os animais de companhia têm características (a nível epidemiológico, biológico, morfológico e clinicopatológico) que permitem preencher o espaço de reprodutibilidade que existe entre os estudos *in vitro* e *in vivo*, sendo que estes estudos viram já provada a sua relevância na

compreensão de muitos aspetos moleculares complexos dos processos tumorais que afetam o ser humano, assumindo-se então como uma ferramenta de trabalho muito atrativa na investigação oncológica (Kumaraguruparan, Prathiba, & Nagini, 2006; Antuofermo et al., 2007; Pinho et al., 2012). Os estudos *in vitro* permitiram chegar a conclusões importantes sobre os mecanismos moleculares do cancro sendo que as condições de trabalho com linhas de células tumorais podem ser altamente controladas e os resultados são altamente reprodutíveis, permitindo a validação, repetição e otimização em ensaios experimentais. Além disso, não estão limitadas pelos condicionamentos práticos e éticos dos modelos *in vivo*. Contudo, continuam a existir limitações importantes: a maior parte das linhas celulares usadas no estudo do cancro foram geradas por passagens seriadas e submetidas a seleções. No decorrer deste crescimento seletivo controlado ocorre frequentemente a seleção de características fenotípicas que permitem a melhor adaptação ao crescimento *in vitro*. Esta seleção pode incluir clones com um dado conjunto de expressões génicas, funções e características morfológicas não desejadas (Pinho et al., 2012). Para além disso, é excluído o microambiente do tumor, o seu contexto, inibindo a análise de fenómenos complexos que ocorrem nas condições *in vivo*. Ultrapassando as características relacionadas com os tumores em si, é pertinente referir ainda a similaridade crescente de características ambientais a que estão sujeitos humanos e animais domésticos, que os coloca num nível equivalente de exposição a carcinogéneos (Knapp & Waters, 1997; Rezia, Tavasoli, Bahonar, & Mehrazma, 2009; Rivera & von Euler, 2011; Gupta et al., 2012), e que nos permite justificar a grande similaridade de etiologia e de patogénese dos tumores nas duas espécies (MacEwen, 1990; Vail & MacEwen, 2000; Khanna, Lindblad-Toh & Vail, 2006; DGS, 2013; Marconato, Gelain & Comazzi, 2013). Sumariando, o modelo canino de tumor mamário poderá fornecer uma ferramenta valiosa com múltiplas aplicações translacionais para a Oncologia humana, tais como a identificação de novos genes associados à carcinogénese, o estudo de fatores de risco ambientais, a compreensão da biologia molecular do tumor e a avaliação e desenvolvimento de novas formas de diagnóstico, prognóstico e terapêutica, que irão beneficiar tanto os pacientes humanos como animais (Pinho et al., 2012).

Referidos os benefícios óbvios em usar os nossos animais domésticos como modelo com o fim de chegar a conclusões que podem, de alguma forma, vir a alterar a forma como se diagnostica e trata aquela que continua a ser uma das maiores frustrações na Medicina humana, como futura médica veterinária não posso deixar de enfatizar a importância de estudar a complexidade destes processos, os compreender e progredir no sentido de uma melhor qualidade de vida e diminuição do sofrimento, durante o maior tempo possível, naqueles que nos trouxeram aqui, por eles mesmos.

II 3. A glândula mamária

II 3.1 Enquadramento histórico e importância

A glândula mamária teve um papel crucial na classificação taxonómica e evolução das espécies animais (Capuco & Akers, 2009) sendo mesmo decisiva na aceitação da teoria da evolução de Darwin. A sua presença e a sua capacidade secretória providenciaram a base para a inserção de várias espécies na classe *Mammalia*, há mais de dois séculos (Oftedal, 2002). O leite secretado assume um papel preponderante na nutrição do neonato, assegurando simultaneamente o estabelecimento de competência imunológica e endócrina (Goldman, 2002; Bösze, 2008) e a necessidade de contacto íntimo entre o neonato e a mãe durante a amamentação constitui uma base de desenvolvimentos comportamentais não despididos (Peaker, 2002). Os detalhes da lactação são, no entanto, variados, e resultado de evoluções diversas no sentido de acompanhar as necessidades reprodutivas e ambientais de cada espécie. Naturalmente, essa diversidade fisiológica terá paralelo a nível constitutivo. Nos mamíferos placentários, por exemplo (dos quais fazem parte a mulher e a cadela) o desenvolvimento da glândula mamária na gestação leva à diferenciação de células alveolares secretoras. Este processo e o início da síntese copiosa de leite são reguladas para coincidir com o parto (com a progesterona a assumir um papel crucial na regulação destes eventos pelo seu decréscimo, ao qual se soma a sinergia de efeitos de outros estímulos endócrinos), mantendo-se a composição do leite secretado sensivelmente constante ao longo de todo o período de amamentação. Já nos marsupiais, nascendo as crias muito imaturas e sendo compensatoriamente longo o período de lactação, esta secreção vai variando muito em composição ao longo do tempo, sendo também a estimulação endócrina completamente diferente (a progesterona, por exemplo, não tem qualquer importância na regulação) (Nicholas, Simpson, Wilson, Trott & Shaw, 1997; Capuco, 2009). Existindo então características tão distintas a nível funcional e morfológico nas espécies que têm esta primeira necessidade de nutrição assegurada pela glândula mamária, a lactação parece ser uma característica reprodutiva antiga, anterior à origem dos mamíferos. Uma teoria convincente para a evolução da glândula mamária e lactação foi elaborada por Olav Oftedal (2002), de acordo com a qual as características dos atuais mamíferos são resultado da acumulação de alterações graduais em antepassados sinapsídeos, tendo a glândula mamária evoluído a partir de glândulas apócrinas associadas a folículos capilares. Concretamente, é assumida por vários autores a teoria de uma modificação das glândulas sudoríparas, passando a designar-se estas então como glândulas apócrinas modificadas (Banks, 1993; Dellman & Eurell, 1998; McGeady, 2006).

II 3.2 Anatomia

Na cadela as mamas são normalmente em número de 10, nem sempre dispostas de forma simétrica, em duas cadeias mamárias paralelas à linha média na parede abdominal, estando separadas por um sulco intermamário. Estendem-se da região torácica à região inguinal (Barone, 1976; Getty, 1981a; Sorenmo, Rasotto, Zappulli & Goldschmidt, 2011) e, do sentido cranial para o caudal designam-se, sucessivamente, primeiras ou torácicas craniais, segundas ou torácicas caudais, terceiras ou abdominais craniais, quartas ou abdominais caudais e quintas ou inguinais (Barone, 1976; Peleteiro, 1994). Podem existir glândulas em número inferior ao normal (comummente por inexistência do primeiro par abdominal) (Barone, 1976), ou em número superior (nas regiões torácica e abdominal) (Getty, 1981a). As tetas ou papilas da mama são curtas, apresentando nos ápices 6 a 12 pequenos orifícios correspondentes às aberturas dos ductos excretores (Getty, 1981a).

II 3.3 Sistema de drenagem linfática e circulação sanguínea

Nas cadelas existe interseção da rede linfática das glândulas mamárias entre algumas glândulas ipsilaterais (Patsikas et al., 2006) e estão descritas várias interconexões ou anastomoses entre os centros linfáticos contralaterais, esquerdo e direito e entre eles e os linfonodos superficiais inguinais (Köning, 2004), poplíteos e torácicos (Pereira, Rahal, de Carvalho Balieiro & Ribeiro, 2003).

De uma forma muito sumária, em cadelas sem patologia mamária neoplásica, as glândulas torácicas drenam para os linfonodos axilares propriamente ditos e acessórios e, ocasionalmente, simultaneamente para os linfonodos esternais. As glândulas mamárias abdominais craniais drenam para os linfonodos axilares propriamente ditos e acessórios e para os inguinais superficiais simultaneamente, o que acontece por drenagem direta ou através da ligação homolateral entre as glândulas abdominais craniais. As glândulas abdominais caudais e as glândulas inguinais drenam nos linfonodos inguinais superficiais, sendo que as glândulas caudais também podem drenar nos linfonodos ilíacos mediais (Getty, 1981b; Köning et al., 2004; Patsikas et al., 2006). Desta forma o sistema linfático é extremamente importante na forma de disseminação das células tumorais.

Em termos de circulação sanguínea, os principais vasos que irrigam as glândulas mamárias são a artéria epigástrica superficial cranial, os ramos lateral e ventral da artéria intercostal e as artérias torácica interna e lateral que irrigam as mamas torácicas craniais e caudais; os vasos

epigástricos superficiais craniais que irrigam as mamas torácicas craniais e as mamas abdominais craniais; e os vasos epigástricos superficiais caudais que irrigam as mamas abdominais caudais e as inguinais (Fossum, 2007).

II 3.4 Histologia

Em termos histológicos as mamas correspondem a glândulas tubuloalveolares compostas. Designam-se glândulas apócrinas modificadas pelo facto de apenas os lípidos serem secretados de forma apócrina, sendo os outros constituintes da secreção (proteínas e hidratos de carbono) secretados de forma merócrina (Banks, 1993; Misdorp, Else, Hellmén & Lipscomb, 1999; Junqueira & Carneiro, 2008). Existem na sua constituição uma parte parenquimatosa (onde os alvéolos são a unidade funcional) e o estroma (tecido conjuntivo de suporte), onde estão localizados os ductos, os vasos e os nervos (Köning et al., 2004; Solano-Galego, 2010). Como órgão secretor complexo, consiste de vários tipos celulares: células epiteliais que formam a rede ductal da glândula e os alvéolos, adipócitos que constituem o pânículo adiposo no qual a rede ductal está inserida, células endoteliais, células do estroma (incluindo fibroblastos) e uma grande variedade de células do sistema imunitário (Watson & Khaled, 2008). Há, contudo, dois tipos principais de epitélio na glândula mamária: o luminal e o basal. O epitélio luminal constitui o revestimento dos ductos e dos alvéolos secretores enquanto o epitélio basal consiste *essencialmente* em células mioepiteliais, facilitadoras da expulsão do leite, contraindo-se sob a ação da ocitocina (Cunningham, 2007; Watson et al., 2008). Estes dois tipos de epitélio formam uma estrutura em bicamada, cada uma de epitélio simples, inserida no estroma, estando as células mioepiteliais dispostas ao redor das células luminiais e alvéolos (Cunningham, 2007; Junqueira et al., 2008; Watson et al., 2008).

Tridimensionalmente, os alvéolos agrupam-se em lóbulos (Köning et al., 2004), que se separam dos circundantes por septos de tecido conjuntivo denso e tecido adiposo. Estes lóbulos contêm as ramificações correspondentes às unidades lobulares terminais ductais (ULTD) que terminam em pequenos ácinos dispostos em forma de cacho de uva. Da convergência destes lóbulos resultam os lobos (Junqueira et al., 2008). Nem todas as células, túbulos secretórios e alvéolos estão ativos ao mesmo tempo. Um ou dois alvéolos drenam para um túbulo secretor (ducto intralobular), revestido, na parte inicial, de células secretórias colunares e, na generalidade, de células cuboides (Junqueira et al., 2008). Os ductos intralobulares drenam para um ducto lobular não secretório, este revestido de células cuboides ou colunares. Os ductos lobulares, como primeiros ductos excretores de um lóbulo, coletores de toda a secreção deste, drenam para um

ducto lobar (Banks, 1993) lactífero (Köning et al., 2004), ou galactóforo (Cunningham, 2007). Estes podem expandir-se, resultando numa dilatação ampolar designada seio lactífero (Köning et al., 2004) ou galactóforo (Cunningham, 2007). O epitélio dos ductos lobares e do seio lactífero consiste numa camada dupla de epitélio colunar estratificado (Banks, 1993). Funcionalmente, os ductos servem o propósito do transporte do leite, funcionando os seios como cisternas de recolha. O acesso ao exterior faz-se através do teto ou papila da mama (Köning et al., 2004). A parte papilar do seio lactífero continua-se com a pele pelo ducto papilar (Banks, 1993).

II 4. Carcinogénese

Para um entendimento daquilo que é o cancro e o que está na sua origem, na base do seu desenvolvimento e progressão, temos necessariamente que partir de uma ideia base simples mas incontornável: não se trata de uma única doença. As características das doenças que fazem parte desta nomenclatura são tão diversas a tantos níveis que se pode mesmo considerar como elemento comum único uma proliferação e um crescimento celular descontrolados de um conjunto de células e tecidos (Morris & Dobson, 2001). É nesta altura irrefutável que se trata de uma doença de base genética (Misdorp et al., 1999, Misdorp, 2002), relacionada com a acumulação de mutações que eliminam as limitações normais de proliferação e integridade genética numa célula somática (Misdorp et al., 1999). Um fator de mutagénese importante é simplesmente a taxa de erro inerente à ação das enzimas que controlam a replicação do ADN (ácido desoxirribonucleico). Esta diz-nos que, por cada ciclo de divisão celular, é introduzida 1 mutação por 1 000 000 a 10 000 000 bases replicadas. Considerando que a maioria dos genomas de mamíferos compreende 2-3 000 000 000 pares de bases, *cada* divisão de *uma célula* suscetibiliza a célula filha a largas centenas de mutações no seu ADN (Sorenmo et al., 2013). Quando, também com a repetição de erros (importância do fator idade), alguns eventos escapam aos mecanismos de reparação do ADN, a acumulação destes pode-se traduzir numa transformação da célula. A maioria das mutações (em termos gerais, causada por fatores extrínsecos ou intrínsecos) é silenciosa, não afetando o funcionamento normal da célula. Contudo, pode resultar deste processo a desativação de genes supressores de tumores ou a ativação de proto-oncogenes que, respetivamente, inibem ou promovem a sobrevivência e a divisão celular (Sorenmo et al., 2013). Apesar de as alterações chave ocorrerem dentro da sequência de ADN, podem também ocorrer alterações adicionais na transcrição ou tradução (Morris et al., 2001).

O modelo da “iniciação, promoção e progressão”, um dos primeiros modelos a reconhecer uma progressão sequencial de mutações, é muito útil como ponto de partida para a definição da base genética do cancro (Modiano & Breen, 2007). Na *iniciação*, um evento genético (e epigenético) iria dotar uma célula somática de potencial replicativo ilimitado ou de outra vantagem de crescimento ou de sobrevivência em relação a outras células, motivada pela exposição a um agente carcinogénico (Modiano, 2013). A salientar que uma única mutação, por si só, nunca seria suficiente para atribuir à célula a capacidade de desenvolver um tumor e ultrapassar as limitações ambientais (mecanismos homeostáticos) a esse crescimento. “Evento” não corresponde a uma única mutação mas, com maior probabilidade, representa uma série de mutações que agem em concertação para alterar o fenótipo funcional e morfológico da célula (Modiano & Breen, 2007; Modiano, 2013). A *promoção* corresponde à acumulação de alterações genéticas adicionais que adicionam às capacidades desta célula a de se desenvolver neste ambiente, permitindo-lhe então concretizar o seu potencial e levando possivelmente ao aparecimento de uma massa tumoral concreta e identificável (Modiano, 2013). A terceira série de eventos (*progressão*) ocorre no sentido de reforçar o potencial de malignidade desta, potenciando a invasão de tecidos normais, sua destruição e metástase (Modiano, 2013). A neoplasia mamária invasiva é então o resultado de uma evolução em passos múltiplos, cujo processo pode ser observado como uma série de lesões histológicas e moleculares progressivas. Embora este modelo peque por ser excessivamente simplista e tecnicamente imperfeito (evidência experimental mostra claramente que as mutações são processos estocásticos e não ocorrem passo a passo) (Heng, 2007), é útil para explicitar os eventos que levam à carcinogénese e continua a ser a base da nossa atual compreensão da genética e evolução do cancro (Modiano, 2013). Douglas Hanahan e Robert Weinberg publicaram, em 2000, um artigo de revisão no qual sintetizaram, em seis características adquiridas essenciais, os requisitos para a transformação celular (*Hallmarks of cancer*). Nele sugerem que a maior parte dos cancros, se não todos, adquire este mesmo conjunto de características/capacidades funcionais durante o seu desenvolvimento, mesmo que através de estratégias mecanísticas diversas. São elas a autossuficiência em sinais de crescimento, a insensibilidade a sinais anti-crescimento, a capacidade de evasão à apoptose, o potencial replicativo ilimitado, a angiogénese sustentada e a capacidade de invasão de tecidos e de metastização. Mais que criar uma lista de eventos, estes investigadores criaram uma alteração no nosso paradigma de entendimento do cancro e a definição de alguns conceitos importantes. Assim, não se considera ou procura um gene que seja universalmente responsável pela transformação, encontrando-se inclusivamente um número mínimo de 5 ou 6 mutações necessárias para a transformação do fenótipo (Ley et al., 2008). Cada um dos passos é regulado por várias vias bioquímicas interativas permitindo, por

um lado, o aparecimento de vários fenótipos indistinguíveis em mutações de vários genes diferentes que partilham a mesma via bioquímica e, por outro, o aparecimento de fenótipos de cancros biologicamente muito diferentes com mutações num mesmo gene. A considerar também que as interações entre o cancro e o seu microambiente são absolutamente fundamentais no comportamento do tumor. Em 2011 foi feita uma atualização a este “resumo”, juntando-se algumas informações relativas à instabilidade do genoma, mutações, papel da inflamação como promotora do tumor, evasão ao sistema imune e reprogramação do metabolismo energético (Hanahan & Weinberg, 2011).

A etiopatogénese dos tumores mamários caninos está ainda envolta em alguma incerteza, apesar da multiplicidade de estudos que dão conta das alterações genéticas que poderão estar na sua base. Temos como exemplo destas a atividade de oncogenes como os da família EGFR, de genes supressores tumorais como *p53*, (Ahern *et al.*, 1996; Rungsipipat *et al.*, 1999; De las Mulas *et al.*, 2003), a suscetibilidade ao gene *BRCA1* (Rivera *et al.*, 2009), a instabilidade cromossómica pela aneuploidia de ADN (detetada em 50 a 60% dos tumores mamários caninos) (Hellmén *et al.*, 1993; Rutteman, Withrow & MacEwen, 2001), mecanismos epigenéticos (metilação do ADN, *imprinting* e modificação das histonas), etc. Outro tipo de fatores frequentemente implicados na génese tumoral são os hormonais, pelo papel fundamental que desempenham no controlo do crescimento e do desenvolvimento normais das glândulas mamárias. Estes fatores serão discutidos de forma mais aprofundada no contexto da sua constituição como fatores de risco e considerando o seu valor prognóstico.

II 5. Apresentação clínica

Os tumores mamários nas cadelas são normalmente identificados como nódulos ou massas discretas, detetados à palpação pelo dono ou no exame de estado geral de rotina. Aproximadamente, até 70% das cadelas inteiras, à altura do diagnóstico, apresenta mais de um tumor (Peteleiro *et al.*, 1993b; Peteleiro, 1994; Sorenmo *et al.*, 2009), sendo mais frequentemente afetadas as 2 glândulas mamárias mais caudais, onde o tecido mamário é mais abundante (Peteleiro *et al.*, 1993b; Peteleiro, Branco & Correia, 1996; Lana, Rutteman & Withrow, 2007; Sorenmo *et al.*, 2011).

Dependendo do grau de desenvolvimento do tumor e do seu comportamento biológico, este apresenta variações significativas, nomeadamente de dimensões, mobilidade, ulceração, presença ou ausência de linfadenomegália (Sorenmo *et al.*, 2009), etc. A ocorrência de sinais sistémicos de doença em cães bem cuidados ou relativamente vigiados são raros, mesmo

considerando a possibilidade de metastização à distância. Exceção a estes é o carcinoma inflamatório, relativamente incomum mas extremamente agressivo pela extensa invasão dos vasos linfáticos da derme e consequente resposta inflamatória, afetando múltiplas glândulas mamárias e a pele envolvente. Além da exibição de sinais sistêmicos de doença como anorexia, perda de peso e fraqueza (Perez-Alenza, Tabanera & Peña, 2001; Marconato et al., 2009) é evidente o carácter doloroso deste tipo de neoplasia (Lana et al., 2007), sendo que os restantes são raramente caracterizados por manifestações álgicas. Nódulos de pequenas dimensões, bem circunscritos e firmes à palpação correspondem normalmente a tumores mamários benignos, por oposição aos malignos que geralmente apresentam crescimento rápido, invasão e fixação à pele e tecidos vizinhos, ulceração ou inflamação (Sorenmo et al., 2011). Apesar de poderem ser clinicamente considerados como entidades separadas e distintas, etiologicamente estes tumores estão relacionados e associados (Sorenmo et al., 2009; Sorenmo et al., 2011) pela teoria da existência de um *continuum* histológico dinâmico (Sorenmo et al., 2009), com os tumores malignos a surgir como fase última da transformação ou de evolução dos benignos pré-existent (Sorenmo et al., 2011).

II 6. Diagnóstico

Considerando a elevada incidência desta doença, o clínico deverá ter sempre presente a importância de reunir dados que constituam uma história clínica rigorosa. Conhecer os fatores de risco para as neoplasias mamárias, caracterizar bem o animal e estar especialmente atento aos que se sabe apresentarem fatores de risco (Capítulo II 7) é uma forma importante de detetar precocemente alterações à normalidade mamária. Neste sentido, será importante atender à raça, idade, tipo de alimentação, *status* reprodutivo (inteiro ou castrado), regularidade dos ciclos, história de contraceção, história de pseudogestação, etc. Sempre que haja a deteção de massas ou nódulos à palpação, o clínico deve também reunir a maior quantidade de informação possível sobre a lesão (data de aparecimento e tipo de progressão da lesão, manifestação de prurido, secreção) (Peteleiro et al., 1993b; Peteleiro, 1994), bem como efetuar o exame físico completo; procedimentos fundamentais para providenciar o tratamento mais seguro e adequado. Deve-se proceder a uma palpação mais focada e extremamente cuidadosa, sendo que é possível a deteção de nódulos com diâmetro superior a 0,5 centímetros (Peteleiro et al., 1993b). Pela maior frequência destes nas glândulas caudais estas devem merecer especial atenção, mas a palpação deve ser feita à totalidade do tecido mamário (Peteleiro et al, 1993b; Morris et al., 2001), inspecionando e espremendo também os mamilos para a avaliação de dor e de existência de

excreção. Finalmente, a palpação deverá estender-se aos linfonodos regionais no sentido de se verificar a ocorrência de hipertrofia (Peleteiro et al, 1993b). Dados provenientes de exames ao sangue como do hemograma e das análises bioquímicas (Sorenmo et al., 2013), para além da utilidade no âmbito de análises pré-cirúrgicas, poderão ser úteis no estadiamento da doença e na escolha do tratamento. Quanto à possibilidade de metastização para os pulmões, nem sempre está implicada a existência de sinais de invasão tumoral nos linfonodos, razão pela qual se recomenda a realização sistemática de radiografias torácicas em três planos (lateral esquerdo, lateral direito e ventrodorsal) para seu despiste (Peleteiro et al., 1993b). Adicionalmente, dada a diversidade de locais de metastização possível, poderá ser feita ecografia abdominal no sentido de inspecionar outros órgãos suscetíveis e, no fundo, para que haja um melhor conhecimento da fase evolutiva e da extensão do processo neoplásico (Sorenmo et al., 2013). De salientar que apenas as lesões maiores que 0,5 cm são reconhecíveis radiograficamente, pelo que a não deteção de um sinal radiográfico compatível com metastização não elimina a possibilidade da ocorrência desse processo (Peleteiro et al., 1993b).

Uma outra forma de diagnóstico é a citologia, feita por punção aspirativa de agulha fina (PAAF) que deverá, sempre que possível, ser feita pelo próprio patologista (Peleteiro et al., 1993b). As vantagens desta técnica estão no facto de não ser traumatizante, não ser necessária anestesia e permitir obter material de elevada qualidade (Peleteiro et al, 1993b). Para animais que não podem ser submetidos a cirurgia, este exame pode ser uma mais-valia na obtenção de um diagnóstico. Dadas as características especiais das neoplasias mamárias caninas (grandes dimensões, heterogeneidade tecidual, variedade na constituição celular) esta não é uma técnica de utilidade unânime (Peleteiro & Correia, 1992; Zuccari, Santana & Rocha, 2001). Para alguns a sua aceitação relaciona-se com a possibilidade da identificação da lesão (neoplásica, inflamatória ou hiperplásica) (Queiroga & Lopes, 2002; Lana et al., 2007; Sangha et al., 2011) permitindo descartar possíveis diagnósticos diferenciais como mastite (Langenbach, McManus, Hendrick, Schofer & Sorenmo, 2001), lipoma e mastocitoma (Queiroga et al., 2002; Lana et al., 2007; Sorenmo et al., 2013). Está também descrita a sua utilidade na deteção de metástases a nível dos linfonodos regionais (Sangha et al., 2011) com uma sensibilidade de 100% e especificidade de 96% (Langenbach et al., 2001). Peleteiro et al. (1993b) e Cassali (2014) consideram mesmo que deve ser a primeira escolha sempre que haja dúvidas sobre a natureza neoplásica de uma lesão em que não haja nódulos individualizados, em casos de recorrência ou em casos de hipertrofia dos linfonodos. A avaliação citológica dos linfonodos envolvidos na drenagem linfática das mamas afetadas revelou-se como uma técnica de grande sensibilidade para a deteção de doença metastática de tumores sólidos (Langenbach et al., 2001) sendo que

na presença de resultados positivos ou suspeitos estes devem ser excisionados (Sorenmo et al., 2003; Cassali et al., 2014).

II 6.1 Estadiamento TNM

A determinação do estadio clínico permite definir a extensão do tumor permitindo, consequentemente, o estabelecimento de um prognóstico e de um planeamento do tratamento, dando ao patologista indicações precisas sobre o material enviado para análise, decorrentes de observações clínicas originadas de diversas fontes (Peleteiro et al., 1993a; Sobin & Wittekind, 1997, Sorenmo et al., 2013; Cassali et al., 2014). O estadiamento clínico é determinado de acordo com o sistema TMN estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para os tumores mamários caninos (Owen, 1980).

Tabela 1 – Estadiamento clínico (TNM) de tumores mamários caninos (adaptado de Sorenmo et al., 2013).

Sistema Modificado			
	T - Tumor Primário	N - Linfonodos Regionais	M - Metástase à distância
	T1 < 3 cm	N0 - Sem metástase	M0 - Sem deteção de metástase
	T2 3-5 cm	N1 - Presença de Metástase	M1 - Deteção de metástase
	T3 > 5cm		
Estadio I	T1	N0	M0
Estadio II	T2	N0	M0
Estadio III	T3	N0	M0
Estadio IV	Qualquer T	N1	M0
Estadio V	Qualquer T	Qualquer N	M1

Atualmente a maioria dos oncologistas utiliza uma versão modificada (Tabela 1) do sistema originalmente proposto que permite classificar a progressão da doença em 5 estadios (Sorenmo et al., 2013), de acordo com as dimensões da lesão primária (T), envolvimento dos linfonodos regionais (N) e a existência ou não de metástases à distância (M) (Peleteiro et al., 1993a). Estes dados em si fornecem informações importantes sobre a malignidade da doença, a expectativa de

sobrevivência e o prognóstico em geral (Hellmén et al., 1993; Sobin et al., 1997; Ferreira, Bertagnolli, Cavalanti, Schmitt & Cassali, 2009; Sorenmo et al., 2013; Cassali et al., 2014). No caso dos tumores múltiplos deve ser atribuída uma classificação individual a cada neoplasia (Peleteiro et al, 1993a), sendo que o estadio a considerar como correto para o animal é sempre o da neoplasia com maior gravidade ou de categoria T mais elevada. A referir que esta classificação se aplica unicamente a tumores epiteliais, o que Peleteiro (2003a) considera uma limitação excessiva se *a priori*, mas legítima quando usada no estabelecimento de um prognóstico, dada a conhecida superioridade em termos de malignidade das neoplasias sarcomatosas.

II 6.2 Avaliação histopatológica

O método de diagnóstico mais seguro é o exame de biópsias excisionais ou incisionais (Cassali et al., 2014). Além de facilitar a classificação das lesões permite avaliar a infiltração na pele, tecidos moles e vasos sanguíneos circundantes e verificar detalhes concernentes à histomorfologia do tumor (Ferreira, Bregunci, Schmitt & Cassali, 2003; Cassali et al., 2014).

II 6.2.1 Classificação histológica

A classificação de neoplasias mamárias tem-se baseado essencialmente na histopatologia (morfologia descritiva) e, numa fração menor, na origem histogenética e prognóstico (Fowler, Wilson & Koester, 1974; Hampe & Misdorp, 1974; Benjamin Lee & Saunders, 1999; Morris, 2001; Misdorp, 2002). À primeira “Classificação Histológica Internacional de Tumores dos Animais de Companhia”, publicada pela Organização Mundial de Saúde (Hampe et al., 1974), seguiram-se uma revisão em 1999 (Misdorp, 1999) e a proposta de uma nova classificação por Goldschmidt, Peña, Rasotto & Zappulli (2011).

II 6.2.2 Atribuição do grau de malignidade

Para atribuição do grau de malignidade os tumores mamários epiteliais são classificados de acordo com critérios histopatológicos específicos (Sorenmo et al., 2013). Existem vários sistemas de classificação da malignidade para tumores mamários caninos elaborados a partir do

Sistema Numérico de Elston e Ellis (1991) estabelecido para a mulher, também conhecido como Método de Nottingham, posteriormente modificado por Elston e Ellis (1998).

Todos os sistemas se têm baseado na avaliação de 3 características morfológicas: a formação tubular, o pleomorfismo nuclear e a contagem mitótica (Castagnaro et al., 1998; Misdorp et al., 2002; Clemente, Perez-Alenza, Illera & Peña, 2010a). De duas modificações ao sistema numérico humano (Misdorp et al., 2002; Clemente, Perez-Alenza, Illera & Peña, 2010a) resultou que um deles (Clemente et al., 2010a) se afirmou com melhor capacidade preditiva do desenvolvimento de metástases (Peña, de Andrés, Clemente, Cuesta & Perez-Alenza, 2013).

Tabela 2 - Critérios para avaliação de grau histológico de malignidade (adaptado de Clemente et al., 2010a e Peña et al., 2013).

Critérios para avaliação de grau histológico de malignidade (adaptado de Clemente et al., 2010a e Peña et al., 2013)		
Formação tubular ^a	Pontos	
	1	Formação tubular > 75%
	2	Formação tubular em 10-75% (formação de arranjo tubular moderada entre áreas de crescimento sólido)
	3	Formação tubular em <10% (formação tubular mínima ou ausente)
Pleomorfismo nuclear ^b	1	Núcleo pequeno e regular ou uniforme com nucléolo ocasional
	2	Variação moderada de dimensões e forma nucleares, núcleo hiper cromático, presença de nucléolos (alguns proeminentes)
	3	Variação marcada nas dimensões nucleares, núcleos hiper cromáticos, frequentemente com mais de um nucléolo proeminente
Mitoses por 10 HPF ^c	1	0-9 mitoses por 10 HPF
	2	10-19 mitoses por 10 HPF
	3	> 20 mitoses por 10 HPF
Grau Histológico de Malignidade (Total)	Pontos	Grau de Malignidade
	3-5	I (baixo, bem diferenciado)
	6-7	II (intermédio, moderadamente diferenciado)
	8-9	III (elevado, pouco diferenciado)

^a em tumores complexos e mistos (com diferenciação mesenquimatosa) a percentagem de formação tubular é considerada por avaliação apenas das áreas epiteliais. Nos mioepiteliomas a formação tubular é classificada como 2. Em carcinomas mamários caninos heterogéneos a classificação tubular deve ser feita considerando a área maligna mais representativa.

^b Em tumores complexos e mistos, o pleomorfismo nuclear deve ser avaliado em todos os componentes.

^c HPF (High-power field - campo de maior resolução) - os campos devem ser selecionados à periferia das zonas com maior atividade mitótica = 0.55mm.

Este, por nós adotado e esquematizado na Tabela 2, é considerado o sistema de avaliação de grau histológico de Peña, tendo parcialmente sido publicado como Clemente *et al.* (2010a). As adaptações basearam-se numa necessidade de considerar algumas especificidades dos tumores mamários caninos em relação aos humanos, como por exemplo apenas uma pequena proporção

de TMC (tumores mamários caninos) metastizar (Benjamin et al., 1999; Clemente, Perez-Alenza, Peña, 2010b; Gama, Alves & Schmitt, 2010), existir nestes uma prevalência muito superior de tumores complexos, mistos e com componente mesenquimatosa maligna (Goldschmidt et al., 2011) e existirem já critérios específicos de malignidade para os TMC. Este sistema considera a heterogeneidade dos carcinomas mamários caninos, indica como devem ser avaliadas as zonas de proliferação mioepitelial e neoplasias mistas e atualiza a avaliação das características nucleares (Peña et al., 2013). Os sarcomas não devem ser avaliados quanto ao grau histológico de malignidade por este sistema (Peña et al., 2013; Sorenmo et al., 2013).

II 6.3 Classificação molecular

Não existem ainda estudos suficientes que apoiem uma classificação *sistemática* dos tumores mamários malignos da cadela de uma perspectiva molecular, à semelhança do que acontece na mulher. Se por um lado o nível de caracterização dos tumores na cadela está muito aquém do que se conseguiu para a mulher, havendo múltiplos resultados com tanto de fiabilidade quanto de divergência, por outro ainda não se estabeleceu o benefício concreto, em termos da prática clínica veterinária, para o fazer. Este tema será desenvolvido no Capítulo II 8.13, relativo ao valor prognóstico de diversos fatores, entre os quais se encontram os marcadores moleculares tipicamente utilizados para proceder a esta subtipificação tumoral na mulher.

II 7. Epidemiologia e causas oncogénicas/fatores de risco

A epidemiologia do tumor de mama canino está naturalmente relacionada com os fatores de risco, sendo o seu estudo descritivo uma base de partida para o estudo destes. Por esse facto estes dois parâmetros serão analisados de forma articulada.

II 7.1 *Continuum* histológico entre benignidade e malignidade

De 50 a 70% das cadelas com TMC apresentam tumores múltiplos (Misdorp et al., 2002; Sorenmo 2003; Sorenmo et al. 2009), podendo ocorrer num mesmo animal tumores de natureza muito diferente e verificando-se, em geral, grande heterogeneidade (Misdorp 2002; Sorenmo

2003; Sorenmo et al. 2009). A maioria dos tumores malignos avaliados corresponde a carcinomas, contabilizando-se uma prevalência de 5% de sarcomas (MacEwen et al., 2013). Foi, não há muito tempo, colocada a hipótese de os tumores mamários se desenvolverem a partir de tumores benignos pré-existentes (Sorenmo et al., 2009). Esta teoria partiu da verificação do facto de as cadelas que apresentam tumores malignos serem, no geral, significativamente mais velhas que as que apresentam tumores benignos, e de os tumores malignos serem significativamente maiores. Dois terços das cadelas examinadas no estudo que colocou primeiramente esta hipótese apresentavam tumores múltiplos, existindo evidências histológicas da progressão para a malignidade com o aumento de tamanho dos tumores. Estes achados sugerem que os TMC podem progredir da benignidade para a malignidade, sendo a malignidade o último estadio de desenvolvimento (Sorenmo et al., 2009). Várias publicações indicam o aumento de risco de desenvolvimento de TMC em cadelas com evidências histopatológicas de lesões pré-malignas (hiperplasias, hiperplasias atípicas e carcinomas *in situ*) ou história de TMC anterior (Antuofermo et al., 2007; Stratmann, Failing, Richter & Wehrend, 2008). Uma explicação para este facto será a totalidade do tecido mamário estar sujeita ao mesmo nível de exposição hormonal, o que prevê a possibilidade do desenvolvimento de vários tumores ao longo do tempo ou da presença de várias formas de desenvolvimento simultâneas (Sorenmo et al. 2009). Sendo esta a teoria prevalente, tanto mulheres como cadelas com diagnósticos anteriores de hiperplasias atípicas ou carcinomas *in situ* parecem estar em maior risco (Antuofermo et al., 2007, Sorenmo et al., 2009; Mouser, Miller, Antuofermo, Badve & Mohammed, 2010). Apesar de maior no lado ipsilateral, o risco encontra-se ainda assim igualmente aumentado para o lado contralateral, sugerindo que as lesões pré-malignas são, além de preditivas, precursoras do desenvolvimento de tumores malignos (Antuofermo et al., 2007; Stratmann et al., 2008; Sorenmo et al, 2009; Mouser et al., 2010).

II 7.2 Incidência

Na ausência de registos clínicos confiáveis sobre a prevalência de tumores mamários malignos em cães ao longo do tempo, é difícil saber se esta se encontra em crescimento. Apesar da existência de fatores que podem contribuir para o aumento do diagnóstico de cancro nos cães, tal como acontece em humanos, esta é uma doença de idades mais avançadas e, como resultado dos desenvolvimentos na saúde e no bem-estar destes, é maior o número de animais que chega a idades em que a incidência é maior (Bonnett & Egenvall, 2010). Os tumores mamários espontâneos da cadela representam a segunda neoplasia mais frequente na espécie canina

(Ferguson, 1985; Madewell & Theilen, 1987; Peleteiro et al., 1993b; Morris et al. 2001; Bonnett et al. 2010; Sorenmo et al., 2013; Cassali et al., 2014), logo a seguir aos tumores de pele. Os TMC ocorrem quase exclusivamente nas fêmeas, representando nestas a neoplasia mais frequente (Dorn et al., 1968; Moe, 2001; Dobson et al., 2002; Egenvall, Bonnett & Ohagen, 2005; Merlo et al., 2008; Bronden et al., 2010). A incidência de tumores mamários é maior nesta espécie do que em qualquer outro animal doméstico e três vezes superior à encontrada no Homem (Villalobos, 2007). A sua incidência exata é de determinação difícil, com resultados muito variáveis dependendo da origem dos estudos e das características da população estudada. A incidência nos Estados Unidos, por exemplo, ou em certos países do Oeste Europeu, tem vindo a mostrar uma tendência decrescente, o que se deve à prática cada vez mais comum de esterilização das cadelas ainda jovens (Egenvall et al., 2005). A maior parte dos estudos, no entanto, baseia-se em populações de cadelas predominantemente inteiras, fornecendo então informações relativas ao verdadeiro risco de incidência em animais no estado natural. Existem estudos que apontam para que os tumores mamários constituam 50 a 70% de todos os tumores (Moe, 2001; Merlo et al, 2008). Para outros autores esta percentagem está entre os 25 a 50% (Moulton, 1990; Misdorp et al., 1999; Sorenmo, 2003). Egenvall *et al.* (2005) estudou a incidência de tumores mamários em cadelas entre os 3 e 10 anos de idade, numa amostra de 80 000 espécimes de diferentes raças, na Suécia, no período entre 1995 e 2002, e chegou a uma incidência de 111 por cada 10 000 animais por ano. Dobson (2002) havia encontrado anteriormente uma de 205 por 100 000 e MacEwen e Withrow, em 1989, uma incidência de 198,6 por cada 100 000 animais por ano. Aproximadamente 41 a 53% dos tumores mamários são malignos (Misdorp et al., 2002; Gupta et al., 2012) podendo ser de mau prognóstico devido a uma elevada taxa de recorrência aliada à ocorrência de metastização. A mortalidade documentada por Egenvall (2005) foi de 6:10 000, aumentando com a idade.

II 7.3 Idade

Existem dados muito díspares em relação às idades em que se verificam as maiores incidências, embora nem por isso divergentes. Deve-se considerar o facto de as várias raças terem tempos médios de vida muito diferentes, o que de alguma forma se traduz sempre num enviesamento dos resultados. Assim, temos Palta (2000) a reportar a maior incidência no grupo etário de 10-12 anos (25,30%), seguido pelo grupo de 6-8 anos (24,13%) e de 8-10 anos (21,26%) e com a menor incidência no grupo dos 0 a 2 anos (2,30%). Nayyar (2002) Sharma (2003) e Bala (2005) encontraram as idades médias de 9,6 anos, 8 e 9,1 anos, respetivamente, com a maior incidência

no grupo 8-10 anos (22,22%) seguido do grupo 12-14 anos (19,44%), sendo estes resultados corroborados por Jain (2006) e Shivani (2007). Este último observou ainda que as lesões neoplásicas benignas ocorreram a uma idade média inferior (6,3 anos) que as malignas (9,7 anos), o que Soremno (2009) veio a confirmar, apesar de com um diferencial menor entre os tipos (idades de 8,5 e 9,5 anos, respetivamente). Gupta (2008) encontrou a idade média de aparecimento de lesões malignas de 10,8 anos e no seu último estudo epidemiológico, em 2012, reiterou o intervalo de 10 a 12 anos como o da maior incidência. Pode-se dizer que os tumores mamários surgem geralmente em animais com idade superior a 6 anos, sendo raro o aparecimento desta neoplasia antes dos 4 anos e estando, nesse caso, normalmente associado a benignidade (Misdorp, 2002; Lana et al., 2007; Sennazli, Vildirim, Sonmez, Arun & Gurel, 2015).

II 7.4 Sexo

A ocorrência de neoplasias mamárias no macho é muito pouco frequente, estando frequentemente associada a alterações hormonais, tais como as relacionadas com tumores testiculares produtores de estrogénios (sertolinomas) (Misdorp et al., 2002). De acordo com Rutteman *et al.* (2001) o risco de desenvolvimento destes tumores em machos está entre 0 e 2,7%, sendo a média inferior a 1%. Saba et al., (2007) descrevem esta probabilidade de ocorrência como 1:62, e consideram-nos, tal como Bearss, Schulman & Carter (2012), maioritariamente benignos. Já Jabara (1969) e Brodey et al. (1983) descrevem-nos como maioritariamente malignos.

II 7.5 Raça e predisposição genética

Existem, reconhecidamente, diferenças no risco de desenvolvimento de certos tipos de tumor de acordo com as raças. Contudo, havendo um número reduzido de estudos epidemiológicos em larga escala sobre a incidência dos diferentes tipos de cancro na população canina, torna-se difícil chegar a conclusões firmes sobre essas diferenças (Dobson, 2013). Apesar de os estudos existentes fornecerem indicações relevantes sobre o risco de tumores mamários para as raças, as conclusões não devem ser consideradas definitivas, pelo facto de os resultados dependerem da prevalência de raças na população em risco (o que explica as diferenças de resultados obtidos em diferentes países). Também a existência de outras doenças hereditárias ou problemas

associados à raça são fatores que podem trazer desvios em relação às conclusões tiradas. Por exemplo, os resultados que apontem para uma pequena prevalência de cancro nos *Bulldogs* podem estar relacionados com a sua curta longevidade ou com a morte precoce por problemas de saúde característicos da raça (*Kennel Club/British Small Animal Veterinary Association Scientific Committee*). Ainda assim, o facto de estes estudos mostrarem predisposições de algumas raças em relação ao desenvolvimento de cancro tem implicações importantes na compreensão da etiologia deste, por se poder inferir uma componente genética ou hereditária. O cão tem uma estrutura populacional única, com cada raça emergindo de um número limitado de fundadores. Acredita-se que o cão tenha evoluído de lobos cinzentos, possivelmente da Europa ou Médio Oriente (Parker, Shearin & Ostrander, 2010; Vonholdt et al., 2010; Wayne & Vonholdt, 2012). Apesar de o cão-lobo ter sido domesticado há 20 000-30 000 anos, e os tipos de cães terem sido gradualmente escolhidos de acordo com as suas capacidades de guarda, caça e pastoreio, foi só há aproximadamente 200 anos que, com as práticas de cruzamentos seleccionados, a população de cães se dividiu em cerca de 300 raças, por todo o mundo. Ao longo deste tempo a realização desta prática resultou numa diminuição da diversidade genética dentro das raças e num aumento da divergência genética entre elas. A heterozigotia nucleotídica média, quando considerada entre raças de cães, é comparável à humana, mas o nível da diversidade genética dentro de uma só raça é consideravelmente menor que da espécie como um todo (Parker et al., 2010). De facto foi estimado que, enquanto a domesticação dos canídeos selvagens resultou numa perda de 5% de diversidade nucleotídica, a seleção das raças resultou numa perda de 35%. As mutações num pequeno número de genes são responsáveis por muitas características da raça, e algumas seleções levadas ao extremo, para exacerbação de características que se pretendem marcadas, diminuíram ainda mais a diversidade genética seleccionando igualmente mutações predisponentes à doença. Os vários estudos apontam para uma maior afeição dos cães de raça pura (Dorn et al., 1968), particularmente de porte pequeno ou miniatura. Destes, os mais usualmente considerados de maior risco são os Caniches (*toy* e miniatura), Chihuahuas, *Dachshunds*, *Yorkshire terriers*, Malteses, e *Cocker Spaniels* (Dorn et al., 1968; Moe, 2001, Dobson & Lascelles, 2011). Das raças maiores, temos os *Springer Spaniel Ingleses*, *Setters Ingleses*, Pastores Alemães, *Pointers*, *Dobermans* e *Boxers* (Dorn et al., 1968; Peleteiro, 1994; Moe, 2001, Dobson et al., 2011).

No global, fazendo um estudo que englobe cães apresentados a consulta, são normalmente os de raça indeterminada que apresentam a maior incidência de tumores mamários em termos absolutos, talvez pelo facto de serem também os que existem em maior número e os mais acessíveis a qualquer dono (Gupta et al., 2012).

Quanto a predisposições genéticas, têm sido estudados genes que se suspeitam implicados na génese dos tumores mamários na mulher, dada a grande homologia entre a sequência genómica da mulher e da cadela (Lindblad-Tod et al., 2005), bem como as diversas similaridades em termos morfológicos, comportamentos biológicos e curso clínico nas duas espécies. Não existe ainda muita informação sobre a existência, frequência e importância das mutações em linhas germinativas e o seu papel no risco de desenvolvimento de TMC o que se deve, em larga medida, ao facto de só recentemente se ter feito o *mapping* da sequência genómica canina (Lindblad-Tod et al., 2005). Contudo, existem já alguns estudos que apontam direções importantes. Dada a extensão dos estudos existentes (e em progresso) sobre esta temática particular e pelo facto de fugir um pouco ao âmbito desta dissertação, mencionamos apenas a influência de mutações nos genes *BRCA*. Mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* foram associadas ao aumento da incidência de tumores mamários numa raça particular - os *English Springer Spaniel* (Rivera et al., 2009; Antuofermo et al., 2007; Nieto et al., 2003). Foi também detetada a sobre-expressão do gene *BRCA2* em tumores metastáticos caninos (Sorenmo et al., 2013; Egenvall et al., 2005; Rivera et al., 2009). Na mulher, as mutações nestes genes condicionam um risco de desenvolvimento de cancro da mama estimado entre 56% e 84% (Eisen et al., 2005). Num subcapítulo posterior a predisposição genética será ligeiramente aprofundada, nomeadamente pela sua importância a nível de prognóstico.

II 7.6 Localização

O desenvolvimento de tumores e de displasias aumenta em número quanto mais caudal for a glândula mamária, sendo as mamas abdominais e inguinais as mais afetadas (Peleteiro et al., 1993b; Peleteiro, 1994; Misdorp, 2002; Sorenmo et al., 2009). Vários autores sugerem que este facto pode estar relacionado com um maior crescimento, peso, lobularidade, secreção e uma maior frequência de nódulos hiperplásicos nas glândulas mamárias caudais (Misdorp, 2002).

II 7.7 Hormonas e fatores de crescimento

Os tumores mamários, tanto da mulher como da cadela, estão sob controlo e dependência hormonal, havendo bastantes similaridades entre estas duas espécies (Thuroczy et al., 2007). Tanto os estrogénios como a progesterona são necessários para o desenvolvimento normal e a maturação da glândula mamária, funcionando como mitogénios do epitélio mamário e indutores

da proliferação do epitélio intralobular ductal (Sorenmo et al., 2013). Este efeito proliferativo epitelial ocorre repetidamente em condições fisiológicas, para cada ciclo éstrico. O risco de desenvolvimento de neoplasias mamárias é essencialmente determinado pela intensidade e duração da exposição do epitélio mamário à ação conjunta de estrogénio e prolactina (por facilitação da ação mitótica do estrogénio, aumentando o número de recetores) (Rutteman et al., 1990; Queiroga et al. 2005; Sorenmo et al. 2013). Nesse sentido, a ovariectomia veicula um efeito protetor, sendo que este é tanto maior quanto mais precocemente se inibir a exposição hormonal (Sorenmo et al., 2013). Assim, se as cadelas forem esterilizadas antes do primeiro estro, têm 0.5% do risco de vir a desenvolver tumores mamários. Depois deste, o risco aumenta de forma exponencial para 8% se antes do segundo estro e 26% se depois deste (Schneider, Dorn & Taylor, 1969, Sorenmo et al, 2013). A proteção conferida pela castração desaparece após os dois anos e meio de idade, quando o risco de desenvolvimento de tumores de mama é praticamente o mesmo que para as cadelas inteiras (Sorenmo et al., 2013). Esta evidência permite considerar a influência hormonal na carcinogénese como um facto irrefutável. A considerar, no entanto, que a ovariectomia depois do desenvolvimento tumoral, ou seja, a remoção da principal fonte de estrogénio endógeno, não promove a remissão tumoral, não havendo evidências de um efeito significativo na progressão da doença maligna considerando quer a taxa de recidiva quer a de sobrevivência (Morris, Dobson & Bostock, 1998). Os recetores de estrogénio e de progesterona estão presentes em proporções maiores no tecido mamário normal e em tumores benignos do que nos malignos (Rutteman, Misdorp, Blanckstein, & van den Brom, 1988), sendo as metástases frequentemente negativas para estes (Sartin et al., 1992; Nieto et al., 2000; Amorim et al., 2008; Mariotti et al., 2013). Pensa-se então que as hormonas esteroides atuem sobre as células alvo principalmente durante as fases iniciais da carcinogénese, perdendo progressivamente o efeito estimulatório ao longo do desenvolvimento da doença para estadios mais avançados (Perez-Alenza, Peña, Del Castillo & Neto, 2000). A exposição a estas hormonas (tanto estrogénios como progesterona) foi recorrentemente indicada como fator de risco para o aparecimento da neoplasia mamária canina (Stovring, Moel & Glattree, 1997; Perez-Alenza et al., 2000; Sleenckx, Rooster, Kroeze, Van Ginneken & Van Brantegem, 2011; Sorenmo et al., 2013). Foi também verificado que as cadelas submetidas a tratamentos com progestinas, utilizadas em Medicina Veterinária para a prevenção do estro ou tratamento de pseudogestações, têm maior probabilidade de desenvolver tumores mamários e os desenvolvem mais precocemente (Sorenmo et al., 2013). De acordo com o *Norwegian Canine Cancer Registry* estas cadelas incorrem num risco 2,3 vezes maior que as nunca tratadas com estas substâncias (Stovring et al., 1997). De variados estudos dedicados à investigação do efeito da dose, duração do tratamento e tipo de hormonas

(progestinas, estrogénios, ou combinação de ambos), apesar de algum grau de discordância, resulta que a maioria concorda que tratamentos baseados na administração de progestinas em doses baixas se traduzem no aumento do risco de aparecimento de tumores benignos enquanto os tratamentos com a combinação de estrogénios e progestinas tende a aumentar o risco de aparecimento de tumores malignos (Sorenmo et al, 2013).

Na mulher, a ocorrência de uma primeira gravidez depois dos 30 anos constitui em si um fator de risco (Lyons, Schedin & Borges, 2009). Na cadela, a idade à primeira gestação ou parto não parece estar relacionada com a ocorrência de neoplasia mamária (Schneider, 1970; Rutteman, 1990, Rutteman *et al.*, 2001), tal como não parece existir um maior risco associado a outros fatores como o número de gestações ou alterações do ciclo éstrico (Perez-Alenza et al., 2000). Em relação ao efeito da ocorrência de pseudogestações existem dados contraditórios pelo que, face à disparidade de resultados, Perez-Alenza et al. (2000) consideram que, em existindo uma associação, esta não será muito expressiva.

Inicialmente pensou-se que os efeitos tumorigénicos do estrogénio seriam mediados por ligação ao recetor, com um aumento da produção de fatores de crescimento e consequente proliferação celular (Pike et al., 1993). Atualmente sabe-se que o estrogénio e os seus metabolitos também têm efeito genotóxico, aumentando o número de mutações e induzindo a aneuploidia, independentemente dos seus recetores (Okoh, Deoraj & Roy, 2011). Já em relação aos efeitos tumorigénicos da progesterona, pensa-se que esta seja responsável pela indução de um aumento da produção da hormona de crescimento (GH) e dos seus recetores (GHR) (Selman et al., 1994, Mol et al., 1999; Queiroga et al., 2008) que, por sua vez, estimulam a proliferação das células tronco mamárias como primeiro passo da carcinogénese mamária (Mol et al., 1999). A hormona de crescimento tem sobre os tecidos mamários efeitos de estimulação direta e indireta, pelo aumento do fator de crescimento insulínico-1 (IGF-1) (Mol et al., 1997). O IGF-1 é tanto um fator de proliferação como de sobrevivência para as células epiteliais mamárias, regulando a expressão de numerosos genes envolvidos no desenvolvimento de tumores mamários caninos malignos (Hamelers et al, 2002; Queiroga et al., 2010a). Estes, tal como o estrogénio e a progesterona, têm uma concentração tecidual de GH e IGF-1 consideravelmente maior que os benignos, e os seus níveis correspondem igualmente a parâmetros clinicopatológicos importantes como taxa de crescimento, tamanho tumoral e tipo histopatológico dos tumores mamários na cadela (Queiroga et al., 2008).

II 7.8 Expressão da Ciclooxigenase-2

As ciclooxigenases, particularmente a Cox-2, estão claramente envolvidas no desenvolvimento e na progressão dos tumores mamários, estando demonstrada a sobre-expressão de Cox-1 e Cox-2 nos TMC (Millanta, Citi, Della Santa, Porcianni & Polli, 2006a; Queiroga, Alves, Pires & Lopes, 2007, Queiroga, Pires, Lobo & Lopes, 2010b; Lavalle, Bertagnolli, Tavares & Cassali, 2009). Estas duas têm funções biológicas diferentes: a Cox-1 é expressa em muitos tecidos e desempenha um papel importante na regulação de funções fisiológicas normais enquanto a Cox-2 está geralmente ausente em células normais, podendo ser induzida por fatores de crescimento, respostas inflamatórias, promotores de tumores e oncogenes (Millanta et al. 2006a; Queiroga et al. 2007b). Vários estudos mostram que a expressão da Cox-2 é mais frequente e intensa nos TMC malignos que nos benignos (Millanta et al., 2006a; Queiroga et al., 2007, Queiroga et al., 2010b). Dependendo dos estudos encontra-se sobre-expressão em 56 a 100% das células tumorais, verificando-se um menor tempo de sobrevivência nos cães com sobre-expressão da Cox-2 (Lavalle et al., 2009), pelo que a sobre-expressão pode ser considerada um fator de risco.

II 7.9 Dieta

A alimentação baseada em comida caseira foi associada a uma maior prevalência de neoplasias e de displasias mamárias quando comparada com a comida comercial, possivelmente pela presença de um maior teor de gordura insaturada (Perez-Alenza, Rutteman, Peña, Beynen & Cuesta, 1998). Perez-Alenza et al. (1998) haviam já demonstrado que uma alimentação à base de carne de porco e vaca, com pouco consumo de carne de frango, constituía em si um fator de risco. Alguns anos antes, num outro estudo (Sonnenschein, Glickman, Goldschmidt & McKee, 1991), não se havia comprovado que o risco fosse maior em cadelas obesas ou alimentadas com dietas ricas em gordura, mas considerara-se que os cães que haviam sido magros até aos 9-12 meses de idade apresentavam condições de menor risco de vir a desenvolver estas neoplasias. O peso corporal parecia estar então relacionado com o aumento do risco de aparecimento de tumores mamários, quando em excesso, especialmente na puberdade.

II 7.10 Vírus

Existe a hipótese de um envolvimento viral na etiologia das neoplasias mamárias, sendo mesmo considerada a possibilidade de se tratar de uma zoonose. Esta surgiu pelo reconhecimento do facto de, em ratos de laboratório, a etiologia mais comum de tumores mamários ser um retrovírus oncogénico (MMTV- vírus de tumor mamário murino). Em tumores mamários de mulher foram isoladas sequências nucleotídicas bastante semelhantes ao vírus responsável pela afeção nos ratos (Szabo, Haislip & Garry, 2005) e, recentemente, este vírus foi detetado em amostras de tumores mamários caninos e felinos, com percentagens respetivas de 3,49% (3/86) e 18,6% (16/86), não estando esta deteção restrita às massas mamárias tumorais mas encontrando-se também em tecido mamário normal (Hsu et al., 2010).

II 8. Prognóstico

Em termos médicos, quando estamos na presença de uma doença e depois de estabelecido um diagnóstico, a interrogação subsequente imediata, tanto em clínicos como em doentes, refere-se com frequência ao prognóstico. Corresponde à fase de construção e gestão de expectativas por excelência e redireciona, em si, muitas vezes, o empenho no tratamento. Cada uma das propriedades perceptíveis da doença pode ter um significado em termos de futuro, antes mesmo de se avaliar as possibilidades de tratamento e a eficácia deste. Não é só trabalho dos clínicos detetar, identificar e curar, mas cada vez mais gerir e prever. Essa capacidade surge como um indicador de competência e de conhecimento.

Fatores de prognóstico podem ser definidos como características biológicas, clínicas ou patológicas, específicas de indivíduos e tumores, que permitem fazer uma predição do desenvolvimento, desfecho clínico e sobrevivência de pacientes, sem que estes tenham sido sujeitos a terapias adicionais ou adjuvantes depois da cirurgia inicial (Cavalcanti & Cassali, 2006). À semelhança do que é a realidade no universo da Medicina humana, a identificação de parâmetros relevantes a nível de prognóstico constitui uma área de investimento considerável na investigação do cancro mamário canino. Apesar de não serem consensuais, muitas propriedades clinicopatológicas foram já reconhecidas como fatores de prognóstico de valor significativo.

II 8.1 Tamanho tumoral

A dimensão do tumor é um importante fator independente de prognóstico (De las Mulas, Millán & Dios, 2005; Ferreira, Bertagnolli, Cavalcanti, Schmitt & Cassali, 2009; Santos et al., 2013; Sorenmo et al., 2013; Santos et al., 2015). Contudo, sendo consensual a importância do tamanho tumoral, não o são as dimensões a partir das quais o prognóstico se torna pior, de uma forma significativa. Pode-se ainda assim afirmar que a previsão de um prognóstico desfavorável seja diretamente proporcional ao aumento do diâmetro do tumor (Chang et al., 2005; De las Mulas et al., 2005; Ferreira et al., 2009; Sorenmo et al., 2009, Santos et al., 2015). Para alguns autores, as cadelas com tumores de diâmetro superior a 3 cm têm, em relação às cadelas com tumores de menores dimensões, um pior prognóstico, com um tempo de sobrevivência (TS) mais curto (Kurzman & Gilbertson, 1986; Philibert et al., 2003; De Las Mulas et al., 2005, Santos et al., 2015) e uma diminuição do período livre de doença (TLD) (Kurzman & Gilbertson, 1986, De las Mulas et al., 2005, Santos et al., 2015). Para outros, a dimensão tumoral a considerar com significado a nível de alteração de prognóstico é de 5 cm (Morris et al., 1998), estando estatisticamente relacionada com a ocorrência de metástases nos linfonodos regionais (Chang et al., 2005).

II 8.2 Tipo histológico

O tipo histológico de tumor é também um fator prognóstico importante de acordo com um grande número de estudos, sendo definida uma progressão crescente de malignidade, dos carcinomas *in situ* (não infiltrativos) aos sarcomas, passando pelos carcinomas complexos e simples (Hellmén et al., 1993; Misdorp, Else, Helmén & Lipscomb, 1999; Hsu, Hunag, Liao, Wong & Chang, 2009; Santos et al., 2013). Os carcinomas complexos estão geralmente associados a tempos de sobrevivência maiores que os simples o que, apesar de ainda não ser totalmente claro, se pensa estar relacionado com o papel das células mioepiteliais como supressoras da invasão tumoral (Santos et al., 2013). As células mioepiteliais rodeiam a estrutura epitelial nas lesões pré-malignas e carcinomas *in situ*, servindo como barreira que impede a progressão dos carcinomas *in situ* para carcinomas invasivos (Gudjonsson et al., 2002; Man & Sang, 2004). Acredita-se que esta capacidade supressiva das células mioepiteliais esteja dependente de uma boa diferenciação e que as alterações nas expressões dos seus padrões moleculares resultem em alterações de funções celulares, passando a indiferenciação das células

mioepiteliais a relacionar-se com a progressão tumoral (Gudjonsson et al., 2002, Bertagnolli et al., 2009, Cassali et al., 2012).

Os carcinossarcomas e sarcomas estão associados a um pior prognóstico, havendo evidências de maior risco de desenvolvimento de metástases no primeiro ano pós-cirurgia para os primeiros e de mortalidade para os segundos (Benjamin et al., 1999; Chang et al., 2005; Santos et al., 2013). Em relação aos carcinomas simples, a malignidade verificou-se crescente no sentido de tubulopapilares, sólidos e anaplásicos (Bostock, 1992; Misdorp et al., 1999).

Para o carcinoma inflamatório o prognóstico é muito reservado, prevendo-se a morte do animal num muito curto espaço de tempo (Bergman, 2007) pelo facto de, ao momento do diagnóstico, já se verificarem metástases regionais em 96% destes e, à distância, em 32% (Bergman, 2007).

II 8.3 Grau histológico

A avaliação do grau histológico de malignidade pela utilização do sistema numérico de Elston e Ellis (1998) serviu de base a uma multiplicidade considerável de estudos nos TMC (Karayannopoulou et al., 2005; Millanta et al., 2005; Matos et al., 2006; Millanta et al., 2006b; Gama et al., 2008b; de Oliveira et al., 2009; Gama, Alves & Schmitt, 2009; Estrela-Lima et al., 2010; Gama, Alves & Schmitt 2010; Santos et al., 2010; Santos et al., 2011, Santos et al., 2015). Muitos destes estudos demonstraram o valor preditivo do grau de malignidade por análise univariada (Peña et al., 1998; Nieto et al., 2000; Karayannopoulou et al., 2005) não conseguindo, no entanto, encontrar o seu valor independente de prognóstico por análise multivariada (Nieto et al., 2000; Peña et al., 1998).

Peña (2013), depois da adaptação do sistema numérico aos TMC, conseguiu encontrar associações significativas entre o grau histológico e o tamanho tumoral, o estadio clínico, o diagnóstico histológico, a presença ou ausência de proliferação mioepitelial e a metastização regional à altura do diagnóstico. O grau histológico foi ainda associado à recidiva tumoral, à metastização, à morte associada à patologia mamária e respetivos tempos (TS e TLD). Finalmente, o grau histológico foi, a par do estadio clínico e do *status* reprodutivo, considerado um fator independente de prognóstico em análise multivariada, considerando o tempo livre de doença a variável dependente.

II 8.4 Metastização regional e à distância

Um dos melhores indicadores de prognóstico em tumores mamários caninos é a presença de metástases regionais ou à distância na altura do diagnóstico. Em relação ao valor prognóstico do envolvimento de linfonodos regionais, os resultados apontam maioritariamente para a existência de uma correlação entre a presença destas e um pior prognóstico (Hellmén et al., 1993; Perez-Alenza, Peña, Nieto & Castano, 1997; Chang et al., 2005; Karayannopoulou, Kaldrymidou, Constantinidis & Dessiris, 2005; Szczubial & Lopuszynski, 2011) com uma diminuição significativa na sobrevivência. Há, no entanto, estudos nos quais não se conseguiu encontrar qualquer relação (Schneider et al., 1969; Nieto et al., 2000). A presença de metástases à distância surge, na maior parte dos estudos, como um fator de mau prognóstico (Santos et al., 2013).

II 8.5 Idade

Existem dados controversos quanto ao valor da idade do animal como fator de prognóstico. Se alguns estudos associam idades mais avançadas à altura do diagnóstico a uma menor sobrevivência (Schneider et al., 1969; Hellmén et al., 1993; Peña et al., 1998), outros não encontram nenhuma associação com valor estatístico entre estas duas variáveis (Hellmén et al., 1993; Queiroga & Lopes, 2002; Philibert et al., 2003; Chang et al., 2005).

II 8.6 OVH simultânea à cirurgia

Mais uma vez existem estudos com dados contraditórios: Sorenmo (2013) e Chang (2005) demonstraram que as cadelas esterilizadas à altura da cirurgia sobreviveram à doença mais tempo que as inteiras, contradizendo resultados que não encontraram valor prognóstico na cirurgia simultânea (Morris et al., 1998; Philibert et al., 2003).

II 8.7 Infiltração celular linfoide

A relação entre a inflamação ou infiltração celular linfoide tem sido amplamente estudada pelo facto de ser frequente e muitas vezes extensa em tumores sólidos e metastáticos (O'Sullivan &

Lewis, 1994) e pela importância da dinâmica do sistema imune no microambiente tumoral (Coussens & Werb, 2002). A infiltração celular linfóide foi indicada como fator relevante no prognóstico das neoplasias mamárias caninas (Kim et al., 2013a). No entanto, o seu significado prognóstico tem sido algo divergente nos vários estudos. Por um lado, primariamente, esta sinaliza a estimulação da resposta imune do hospedeiro contra o processo tumoral (Ben-Baruch, 2003), tendo a sua presença sido associada a menores taxas de recorrência pós-cirúrgica (Gilbertson et al., 1983). Um outro estudo (Losco, 1986) concluiu que a presença de infiltração eosinofílica local em carcinomas anaplásicos se traduz num atraso na progressão tumoral, enquanto a eosinofilia na vasculatura proximal identifica uma maior possibilidade de disseminação tumoral e consequente pioria a nível prognóstico. Mais recentemente, foi sugerido que é o equilíbrio entre as respostas imunes inatas e adaptativas mediadas pelos linfócitos que afeta a progressão e regressão do cancro da mama na mulher (DeNardo & Coussens, 2007). Os linfócitos T citotóxicos provocam diretamente a morte das células tumorais e os *T helper-1* exercem efeitos antitumorais pela secreção de citocinas (Munk et al., 1995; Moss et al., 2004; DeNardo et al., 2007). Já os linfócitos T reguladores e *T helper-2* são promotores do desenvolvimento tumoral pela supressão de resposta imune antitumoral (DeNardo et al., 2007; Johansson, Tan, Visser & Coussens, 2007; Tan & Coussens, 2007). Foi também encontrada uma correlação entre o elevado grau de infiltração linfocítica e o subtipo molecular, concretamente o subtipo HER-2+ na mulher (Alexe et al., 2007).

Vários estudos identificaram a infiltração linfocitária como um importante biomarcador de prognóstico para o carcinoma mamário canino (Estrela-Lima, Araújo & Costa-Neto, 2010; Carvalho, Pires, Prada & Queiroga, 2011; Saeki et al., 2012). As células T CD3+ foram, em dois estudos, correlacionadas com a capacidade de invasão tumoral e um menor tempo de sobrevivência em cadelas (Carvalho et al., 2011; Saeki et al., 2012). Num dos estudos, a infiltração por células T é muito mais expressiva em tumores malignos que benignos (Carvalho et al., 2011); no outro (Saeki et al., 2012) encontramos resultados perfeitamente antagónicos com uma maior expressão nos benignos. Contudo, os dois estudos são convergentes no que diz respeito à análise do prognóstico quando considerados apenas os carcinomas malignos, verificando-se um pior prognóstico associado sempre a um maior nível de infiltração linfocítica. Adicionalmente, uma maior abundância de células T foi associada a uma maior capacidade invasiva do tumor (Carvalho et al., 2011, Kim et al., 2013). Para os linfócitos B, encontrou-se uma tendência de ocorrência de infiltração mais expressiva em tumores malignos que benignos, apesar de não haver uma diferença estatisticamente significativa (Saeki et al., 2012), e uma maior percentagem de linfócitos B em carcinomas malignos em cães com metástases nos linfonodos (Estrela-Lima et al., 2013). Kim (2013) verificou uma ausência de associação

significativa com a existência de necrose tumoral ou fenótipo molecular, assim como com o tipo histológico, havendo-se no entanto verificado uma infiltração linfocítica expressiva em carcinomas de células escamosas, sendo a menos expressiva foi associada a carcinomas simples. Verificou-se igualmente elevada infiltração linfocítica concomitante à invasão do sistema linfático, à metastização para os linfonodos, em tumores de grau histológico elevado, em casos de estadió clínico avançado e associou-se no geral a uma baixa taxa de sobrevivência. Estes resultados vieram realçar a associação entre a abundância de linfócitos infiltrantes e a maior progressão, agressividade, potencial metastático e, no fundo, malignidade dos tumores.

II 8.8 Necrose intratumoral

A existência de necrose intratumoral está associada a um crescimento tumoral não acompanhado de desenvolvimento vascular suficiente para a promoção de um suprimento sanguíneo adequado, resultando num processo isquémico. A presença de necrose isquémica é assim considerada uma medida indireta (e económica) da taxa de crescimento dos tumores malignos (De Las Mulas et al., 2005). Goldshmidt e Peña (2011) elencam os critérios mais significativos para o diagnóstico e avaliação de malignidade de tumores mamários caninos, considerando neles a presença de áreas de necrose distribuídas aleatoriamente pela neoplasia. Nos trabalhos de De Las Mulas (2005), a necrose surge, a par do tamanho tumoral, do grau histológico de malignidade e da permeação vascular, como *um dos mais significativos* fatores de mau prognóstico por análise univariada, sendo superior, inclusivamente, à metastização a nível dos linfonodos. Por análise multivariada não foi considerada um fator independente de prognóstico, o que se julga justificável pelo facto de neste tipo de análise se considerar também o tamanho como variável (este sim, indubitável fator independente de prognóstico) e estas características estarem tão intimamente relacionadas.

II 8.9 Diferenciação mesenquimatosa

Os tumores mistos são um dos tipos mais comuns de tumores mamários nas cadelas (Cassali et al., 2012). Caracterizam-se pela exibição de um padrão histológico complexo, constituído de elementos epiteliais e mesenquimais, e tendo a capacidade de desenvolver uma transformação

maligna, originando carcinomas e, menos frequentemente, carcinossarcomas e sarcomas em tumores benignos mistos (Misdorp et al., 1999; Cassali et al., 2012). Os tumores benignos mistos são caracterizados pela presença de elementos epiteliais benignos (ductais ou acinares e células mioepiteliais) e células mesenquimais com formação de cartilagem ou osso, eventualmente combinados com tecido fibroso mixoide (Cassali et al., 2012). As células mioepiteliais em proliferação podem exibir uma aparência fusiforme ou estrelada, estando frequentemente circunscritas e dentro de uma matriz extracelular abundante (Cassali et al., 2012). O diagnóstico diferencial de tumores com diferenciação mesenquimatososa quanto à malignidade/benignidade pode ser difícil pelo facto de um certo grau de polimorfismo e de atipia celular serem frequentes, razão pela qual se recorre a técnicas de coloração especial para a análise da integridade da membrana basal, o que ajuda à tomada de decisão sobre a benignidade ou malignidade destes tumores (Gama et al., 2003; Bertagnolli et al., 2009). Inicialmente o termo "tumor maligno misto" foi aplicado a carcinomas que surgiam no contexto de tumores benignos mistos. Contudo, vários autores usavam este termo para tumores mistos em que um ou os dois componentes (epitelial ou mesenquimal) eram malignos (Hampe et al., 1974; Moulton, 1990). O termo carcinossarcoma era usado como sinónimo de tumor maligno misto, mesmo em casos sem transformação maligna de um ou dos dois componentes celulares epiteliais (Hampe et al., 1974). Na classificação por Misdorp et al. (1999) a expressão "tumor maligno misto" foi excluída e substituída por carcinoma em tumor benigno misto, histologicamente diferente de carcinossarcoma. Atualmente o carcinossarcoma refere-se a uma neoplasia que exibe malignidade concomitante dos componentes epitelial e mesenquimal, com um comportamento mais agressivo que o anterior (Benjamin et al., 1999; Misdorp et al., 1999). Nos carcinomas em tumores benignos mistos, a proliferação carcinomatosa pode exibir crescimento *in situ* ou infiltrativo, com perda de continuidade das camadas basal e mioepitelial, associada a invasão do estroma pelas células neoplásicas. Aqui, a lesão anteriormente benigna pode ser completamente substituída por tecido carcinomatoso (Cassali et al., 2012). O estudo fenotípico das células mioepiteliais é importante então no diagnóstico diferencial entre estes tipos de lesões, mas não só. A teoria atualmente mais aceite propõe uma origem mioepitelial para os componentes mesenquimais (Gama et al., 2003; Ramalho et al., 2006). A suportar esta teoria estão alterações na expressão das proteínas constituintes destas células, incluindo a perda da expressão de citoqueratinas, p63, SMA- α e maspina (Gama et al., 2003; Ramalho et al., 2006; Bertagnolli et al., 2009) quando estas se transformam, havendo conservação do fenótipo mesenquimal, confirmado pela presença de vimentina e S100 nas reações imunohistoquímicas (Gartner et al., 1999; Gama et al., 2003). Estudos de Nieto et al. (2003) e Bertagnolli et al. (2009) sobre o conteúdo de ADN em tumores mistos mostram também similaridades entre os

componentes epitelial e mesenquimal, reforçando esta teoria e o papel das células mioepiteliais na metaplasia mesenquimal, bem como a possibilidade de uma origem comum para ambos os componentes a partir de uma célula totipotente com capacidade de diferenciação divergente. Em termos epidemiológicos, os tumores mistos representam 50 a 66% das neoplasias mamárias caninas (Jabara, 1960). Aparecem normalmente em animais dos 6 aos 10 anos de idade, mais frequentemente em fêmeas e nas glândulas caudais (Sittner, 1939; Cotchin, 1947; Cassali et al., 2009; Richards, McNeil, Thompson & Reid., 2001). Dados apontam para que os carcinomas em tumores benignos mistos constituam 10 a 40% dos carcinomas totais diagnosticados (Richards et al., 2001; Cassali et al., 2009) e alguns estudos apontam mesmo este como o tipo histológico mais frequente nas neoplasias mamárias caninas (Cassali et al., 2008; Cavalcanti et al., 2006). Os carcinomas em tumores benignos mistos foram associados a uma sobrevivência média 2 a 3 vezes superior a outros carcinomas caninos, constituindo-se como fator de prognóstico positivo e considerando-se um fator de proteção contra o risco de morte associada à neoplasia (Yamagami, Kobayashi, Takahashi & Sugiyama, 1996; Cavalcanti et al., 2006). Uma explicação para este facto reside no padrão expansivo de crescimento, com reduzida invasão linfática e baixo índice metastático (Misdorp, Cotchin, Hampe, Jabara & von Sandersleben, 1972; Yamagami et al., 1996). Pensa-se que o tamanho da área carcinomatosa incluída num tumor misto canino seja também um fator com influência a nível de prognóstico (Cavalcanti et al., 2006), assim como o tipo histológico dos componentes epiteliais do tumor. Também por estarem inseridos numa lesão benigna, espera-se que estas neoplasias estejam associadas a melhores prognósticos e que os animais apresentem maiores taxas de sobrevivência (Cassali et al., 2012).

II 8.10 Marcadores tumorais

A disponibilidade e aplicabilidade de novas metodologias vieram permitir a identificação de novos fatores de prognóstico que permitiram colmatar algumas insuficiências no estabelecimento de um prognóstico mais acurado. A identificação de marcadores tumorais, além de facilitar a determinação de um prognóstico, traz alguma luz sobre o comportamento da neoplasia.

II 8.10.1 Marcadores de proliferação

O índice de proliferação, determinado por marcadores envolvidos no ciclo celular tais como o PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) e o Ki-67, é considerado de valor prognóstico em carcinomas mamários na mulher (Peña et al., 1998). Alguns autores verificaram, através de estudos de análise multivariada, que estes antigénios nucleares são úteis para a predição do tempo livre de doença e da sobrevivência, assumindo-se como fatores independentes de prognóstico (Peña et al., 1998). Ambos os marcadores estão presentes em células replicantes, embora o Ki-67 deixe de ser expresso depois de finalizada a mitose (não está presente em células quiescentes) e o PCNA, de tempo de semivida mais longo e envolvido também na reparação de ADN, seja também expresso em células fora da fase ativa do ciclo celular (Misdorp et al., 1976; Peña et al., 1998; Scholzen & Gerdes, 2000).

II 8.10.1.1 PCNA

PCNA é uma proteína nuclear que funciona como cofator da polimerase- δ , tanto na fase G0 como na fase de síntese de ADN. A concentração de PCNA aumenta no fim da G1, atinge um pico na fase S e permanece elevada durante a G2 e a fase M, sendo detetada em todas as fases do ciclo celular devido ao longo tempo de semivida. A sua taxa de tradução está diretamente associada à taxa de proliferação das células contudo, sendo uma proteína também envolvida na reparação de ADN, a sua expressão também pode ser induzida por outros estímulos nocivos. O PCNA existe em maior quantidade em tumores malignos do que em tecidos provenientes de uma glândula mamária normal, hiperplásica e de tumores benignos (Peña et al., 1998). Peña (1998) não encontrou nenhuma associação significativa entre níveis elevados de PCNA e baixas taxas de sobrevivência, baixo tempo livre de doença e metastização. Estes resultados foram posteriormente corroborados (Funakoshi et al., 2006; Lopuszynski & Hellmén, 2015).

II 8.10.1.2 Ki-67

O Ki-67 é uma proteína nuclear não histónica expressa durante todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2, e M), sendo rápido o desaparecimento da sua expressão depois da mitose (Scholzen et al., 2000). Tanto em relação a tumores mamários malignos humanos como caninos verificou-se a ausência de correlação entre a expressão de PCNA e Ki-67, o que será atribuível

a esta diferença de expressão nas células quiescentes (Scholzen et al., 2000). Durante a interfase o Ki-67 pode ser detectado exclusivamente dentro do núcleo; na mitose a maior parte encontra-se à superfície cromossomal. O Ki-67 é um excelente marcador para a avaliação do crescimento de uma dada população celular. Ao contrário do PCNA, que não desempenha um papel exclusivo na replicação mas também na reparação do ADN, o Ki-67 está funcionalmente restrito ao seu papel de marcador de proliferação, o que o torna um marcador altamente específico (Gerdes et al., 1984). Em múltiplos estudos sobre a espécie canina foi considerado um fator independente de prognóstico de metastização, tempo livre de doença e sobrevivência (Peña et al., 1998; Nieto et al., 2000; Sarli, Preziosi, Benazzi, Castellani & Marcato, 2002; Zuccari, Santana, Cury & Cordeiro, 2004; Ferreira et al., 2009). Peña (1998) encontrou para o Ki-67 um valor *cut-off* de 24%, acima do qual a probabilidade de desenvolvimento de metástases aumentava em 99%. Verificou-se também existir uma correlação inversa entre a expressão de Ki-67 e a marcação de recetores de progesterona (Cassali, 2000; Sennazli et al., 2015). Quanto à relação com a classificação histológica existem informações contraditórias. Nos estudos de Yang (2006), os carcinomas simples tubulopapilíferos apresentaram níveis de expressão de Ki-67 superiores aos dos carcinomas sólidos, sendo os carcinomas complexos os que apresentaram os maiores índices. Para Sennazli (2015) foram os carcinomas sólidos e fibrossarcomas a apresentar os maiores índices de Ki-67 (expressando igualmente as mais baixas concentrações de RE e RP), sendo os carcinomas complexos e os carcinossarcomas os que apresentaram os índices menores (assim como as maiores expressões de RE e RP). Também para Kozakiewicz (2012) a expressão de Ki-67 foi relacionada com a malignidade, sendo superior nos tumores sólidos, simples e nos tumores de maior grau de malignidade e inferior nos adenomas, à semelhança dos resultados obtidos por Peña et al. (1998) e Nieto et al. (2000). Os resultados obtidos por Santos et al. (2013) concluem da necessidade de considerar a utilização deste marcador como rotina para previsão de prognóstico, já que no seu estudo a expressão de Ki-67 se constituiu como um fator independente de prognóstico de valor superior a outros parâmetros clínicos ou histológicos vulgarmente usados para esse efeito, tais como o tamanho do tumor, o grau histológico de malignidade e o tipo de crescimento. Já Lopuszynski e Hellmén (2015) encontraram evidências de que este deve ser usado apenas como uma ajuda ao estabelecimento de um prognóstico, dada a ausência de correlação em análise de variância entre os níveis deste marcador e o decurso clínico da doença.

II 8.10.1.3 AGNOR

As AGNOR (*Agyrophilic Nucleolar Organizer Regions* - Regiões Organizadoras Nucleolares Argirofílicas) são proteínas nucleares que se acumulam em células muito proliferativas. Nestas células, a quantidade de AGNOR aumenta progressivamente a partir do início da fase G1 e atinge um valor máximo no final da fase S, permanecendo constante até ao fim da fase G2 (Sorenmo et al., 2011). Estas proteínas são particularmente interessantes pelo fato de a sua quantidade na interfase estar relacionada com a rapidez da proliferação celular (Sirri, Roussel & Hernandez-Verdun, 2000). As AGNOR foram já implicadas no prognóstico dos TMC, sendo que o seu aumento está especialmente presente em tumores de comportamento maligno com invasão de tecidos vizinhos, estando associado a um menor tempo de sobrevivência pós-cirurgia (Scholzen et al., 2000; Sarli et al., 2002; Sorenmo et al., 2011).

II 8.10.1.4 Índice mitótico

Considerando formas desenvolvidas mais recentemente de avaliação da proliferação celular em neoplasias, como a morfometria, a citometria de fluxo e a imunohistoquímica, a contagem mitótica continua a ser a forma mais tradicional e simples de estimar a proliferação celular em células tumorais mamárias na mulher, sendo um dos componentes de avaliação do sistema de Bloom-Richardson (Bloom & Richardson, 1957; Elston and Ellis, 1991; Dutra, Azevedo Júnior, Schmitt & Cassali, 2008).

A validade da contagem ou índice mitótico continua envolta em alguma controvérsia e não se pode assumir a existência de um método estandardizado. Ainda assim tem contribuído para o diagnóstico, em Oncologia Veterinária, bem como servido como indicador de prognóstico (Sarli et al., 2002). A este propósito, e no sentido de valorização deste método foram encontradas associações significativas entre o índice de Ki-67 e o índice mitótico por 10 e 40 campos de grande aumento (Dutra et al., 2008).

II 8.10.2 Recetores hormonais esteroides – RE e RP

Os recetores de estrogénio e progesterona fazem parte da família de recetores nucleares de fatores de transcrição, sendo ativados por hormonas esteroides como o 17 β -estradiol, estrona e estriol no caso dos primeiros e progesterona ou progestinas no caso dos segundos (Pearce &

Jordan, 2004; De Abreu et al., 2013; Abdel-Hafiz & Horwitz, 2014). As hormonas esteroides ováricas, estrogénio e progesterona, são responsáveis pelo controlo do crescimento e desenvolvimento ductais (Thakkar, Divyesh & Mehta et al., 2011), desempenhando papéis essenciais no desenvolvimento do tecido mamário normal e na progressão do cancro da mama (Pearce et al., 2004). A progesterona é produzida nos ovários e, em menor quantidade, nas glândulas adrenais, sistema nervoso central, tecido adiposo e, no decorrer da gestação, pela placenta (Abdel-Hafiz et al., 2014). A sua atividade repercute-se a nível mamário pelo controlo da morfogénese do epitélio luminal, pela promoção da alveologénese através das células estaminais e, em termos funcionais, pela supressão da secreção ativa de leite. As vias de sinalização na base destas ações são maioritariamente parácrinas (Abdel-Hafiz et al., 2014).

O estrogénio exerce os seus efeitos biológicos ligando-se aos recetores de estrogénio (isoformas RE α RE β e RE acoplado à proteína G) localizados principalmente no núcleo mas também no citoplasma, aparelho de Golgi e membrana celular. A expressão de RE α é necessária para o desenvolvimento normal da glândula mamária verificando-se, em lesões pré-malignas, um aumento drástico da sua expressão (Thakkar et al., 2011). Será a esta isoforma que nos reportamos quando falamos, genericamente, em recetores de estrogénio (RE). O complexo estrogénio-RE, por vias genómicas e não genómicas, está na origem da ativação de processos nucleares e extranucleares que promovem a proliferação celular e a diferenciação da glândula mamária (Yamaguchi, 2007). Na ausência de estrogénio, o RE mantém-se inativo na forma de molécula monomérica ligada a chaperões. A via genómica diz respeito à atividade transcricional dos RE que ocorre no núcleo (também designada NISS-sinalização esteróide iniciada no núcleo). Nesta, a ligação da hormona ao seu recetor induz a migração do complexo do citoplasma para o núcleo, à qual se segue a dimerização do recetor e a subsequente ligação do dímero a segmentos específicos de ADN. Este complexo dá início, por sua vez, aos eventos que culminam na transcrição de genes específicos para a regulação da produção proteica (Wang et al., 2001; Dunbier et al., 2009).

A via ou atividade não genómica (também designada rápida), independente da transcrição genética, é a atividade biológica mediada por recetores de estrogénio localizados no citoplasma ou associados à face interna da membrana plasmática (Thakkar et al., 2011). Neste caso, os recetores de estrogénio podem associar-se à caveolina-1 (e formar complexos com proteínas G), à estriatina e a recetores das tirosina-cinases (EGFR e IGF-1). Os sinais são transmitidos ao núcleo através da via proteína cinase ativada por mitogénio (MAPK/ERK) e da via cinase-2-fosfoinositol (PI3K/AKT) (Zivadinovic et al., 2005; Dunbier et al., 2008). Esta via contribui fortemente para o crescimento tumoral (Zivadinovic, Gametchu & Watson, 2005).

Na mama normal em maturação, o fator de crescimento epidérmico aumenta o efeito proliferativo do estrogénio e da progesterona induzindo a ramificação lateral ductal e o desenvolvimento lóbulo-alveolar (Thakkar et al., 2011). Os membros da família dos recetores de fatores de crescimento epidérmico (EGFR) são expressos tanto em células epiteliais mamárias normais como neoplásicas, sendo a sua sobre-expressão nas células tumorais preditiva, na mulher, de um mau prognóstico, pela promoção da progressão do tumor pela invasão, angiogénese, metastização e resistência ao tratamento por bloqueio da apoptose (Thakkar et al., 2011). Em tumores com níveis baixos de expressão dos EGFR, particularmente HER-2, os efeitos do estrogénio membranar são modestos. Contudo, se estes níveis forem elevados, da ligação do estrogénio ao recetor extranuclear e da ativação dos recetores dos fatores de crescimento epidérmico com a consequente ativação das suas vias de sinalização, resulta uma alteração significativa da via apoptótica e uma diminuição da expressão de recetores de progesterona (RP) (Thakkar et al., 2011). A expressão de RP depende da regulação estrogénica, pela presença de estradiol e da existência de recetores de estrogénio funcionais (Cui et al., 2005; Thakkar et al., 2011). Os níveis de RP servem então como indicadores de uma via nuclear de RE funcionalmente intacta, ajudando a prever a resposta à terapia hormonal de uma forma mais precisa (uma vez que são necessários níveis adequados de estrogénio e recetores de estrogénio para a transcrição de PR), servindo igualmente como indicador do nível de agressividade do tumor quando na presença de tumores RE positivos (Thakkar et al., 2011). Estudos baseados no tratamento hormonal a cadelas permitiram verificar da necessidade de um longo período de tempo para o desenvolvimento da neoplasia mamária, sugerindo que as hormonas possam atuar como promotoras ao invés de iniciadoras do desenvolvimento dos tumores (Fonseca & Daleck, 2000). Neste tipo de tumores está comprovada a dependência de elevadas concentrações hormonais para a sua proliferação. Contudo, para os tumores cuja indução tenha ocorrido através de um suporte hormonal, existe a tendência de ultrapassar esta fase de dependência para uma de autonomia. Nesta fase pode-se dizer que tenha ocorrido a perda das características de diferenciação celular da linha celular de origem sendo que, morfológicamente, as células se tornam, progressivamente, mais indiferenciadas (Fonseca et al., 2000). Para Sartin et al. (1992) os tumores de mama caracterizados pela existência de RP e RE ou mesmo apenas RE tendem a apresentar melhor prognóstico que os que apresentam apenas sobre-expressão de RP, sendo o prognóstico pior para os tumores sem expressão de qualquer um dos recetores. Já para outros autores, a ocorrência de lesões mamárias com subexpressão de RE associada à sobre-expressão de RP tem sido associada a falsos resultados (Patani, Martin & Dowsett, 2013), considerando-se que, em existindo, estas farão parte, na mulher, de um subgrupo muito reduzido. A deteção de RP em tumores com RE negativos pode

dever-se à ocorrência de falsos negativos para RE, à existência de níveis muito baixos de RE ou, em último caso, de variantes de RE capazes de estimular a expressão de RP não reconhecidas pelo anticorpo usado na técnica imunohistoquímica (Payne, Bowen, Jones, Wells, 2008). De las Mulas (2005) considera, a partir dos estudos de Barnes et al. (1998), que uma das desvantagens dos estudos imunohistoquímicos na avaliação dos RE é a possibilidade da sua não deteção pela existência de defeitos na cascata funcional a nível transcricional, translacional ou pós-translacional, podendo nesse caso estimar-se a função de RE, indiretamente, pela deteção de RP. No geral, o valor preditivo de prognóstico da positividade a recetores de progesterona na ausência de recetores de estrogénio é ainda controverso. Os estudos de Hefti et al. (2013) permitiram-lhe concluir que o subtipo humano RE-/RP+ não é “reprodutível”, assumindo que a expressão de RP não estará associada ao prognóstico em tumores RE negativos nem irá acrescentar informação relevante como fator independente de prognóstico em estudos de análise multivariada que considerem a expressão de RE e outros fatores clinicopatológicos relevantes. Chega a questionar, nomeadamente, a utilidade de se manter a análise deste marcador em exames de rotina ao cancro da mama na mulher. Contemporaneamente, mas contrariamente a este autor, em relação aos TMC, Mariotti et al. (2013) considera a presença de RP um fator de muito bom prognóstico, como já havia sido considerado por outros autores (Misdorp, 1988; Flores & Castaño, 2000; De las Mulas, Ordas, Millan, Chacon & De Lara, 2004; De las Mulas, 2005; Millanta et al., 2005; Thuroczy et al, 2007).

Nesta espécie, aproximadamente 95% dos tecidos mamários normais e 80% dos tumores benignos apresentam concentrações detetáveis de RE, RP, ou ambos. Em 70% dos tumores existem ambos os tipos de recetores e a percentagem de cadelas que apresenta apenas um dos tipos foi documentada como inferior a 20% (Donnay et al., 1995; Rutteman et al., 1988; Millanta et al, 2005). Nos tumores malignos, de uma forma geral, a expressão dos genes que codificam para estes recetores encontra-se diminuída, particularmente nas neoplasias de maior grau de malignidade ou nas fases mais avançadas da doença (Peleteiro, 1994; Millanta et al., 2005). Em relação aos RP, estão documentadas percentagens de tumores malignos positivos a estes marcadores entre os 8% (De Las Mulas et al., 2005) e os 96% (Mariotti et al., 2013). Considerando a expressão de RE, os valores apresentados são igualmente díspares havendo, no que concerne aos tumores malignos, percentagens nas ordens dos 10% (Geraldés, Gartner & Schmitt, 2000), 24% (Graham, O’Keefe & Gelberg, 1999), 50% (Rutteman et al., 1988) 59% (Sobczak-Filipiak & Malicka, 2002) e 87,5% (Nieto et al., 2000).

Apesar de nem sempre se verificarem diferenças significativas entre os diferentes tipos histológicos de tumores, os carcinomas simples e complexos apresentam tendencialmente uma maior expressão que os tipos mais indiferenciados, carcinomas sólidos ou sarcomas (De las

Mulas et al., 2004; De las Mulas et al., 2005; Sennazli et al., 2015). Se tanto a glândula mamária normal como as displasias mamárias e tumores benignos tendem a apresentar níveis de RE e RP superiores aos apresentados pelos tumores malignos, as metástases são, no geral, negativas para ambos os recetores (Sartin et al., 1992; Donnay et al., 1995; Nieto et al., 2000; Amorim et al., 2008; Mariotti et al., 2013). Em vários estudos os níveis mais baixos de expressão de RE e RP foram observados em tumores primários de animais para os quais se verificou a metastização à distância, sendo associadas percentagens decrescentes de imunoreatividade para RE a uma crescente malignidade (Sartin *et al.*, 1992; Nieto et al., 2000; De las Mulas et al., 2005; Chang et al., 2009). Múltiplos estudos associam, a uma expressão inferior destes dois marcadores, a atipia celular, a existência de índices mitóticos elevados, a ocorrência de metastização (Nieto et al., 2000; De las Mulas et al., 2005; Millanta et al., 2005; Thuroczy et al., 2007; Mariotti et al., 2013), o crescimento tumoral (Ferreira et al., 2009) a ulceração (Nieto et al., 2000) e uma maior atividade proliferativa por avaliação da expressão de Ki-67 e PCNA (Geraldés et al., 2000; Cassali et al., 2014). Sobre a relação da expressão dos recetores com a multiplicidade de tumores, os resultados são vários mas contraditórios nas conclusões (Mariotti et al., 2005). Foram também encontradas associações entre a expressão dos recetores de estrogénio e diferentes fatores epidemiológicos, sendo associada uma maior expressão a cadelas mais jovens, particularmente com menos de 8 anos de idade (Nieto et al., 2000, De las Mulas et al., 2005, Mariotti et al., 2013), não submetidas a esterilização (Rutteman et al., 1998; Nieto et al., 2000), com regularidade de ciclos éstricos e antecedentes de pseudogestações (Nieto et al., 2000).

Os estudos destinados a verificar o valor prognóstico dos recetores hormonais são prolíficos e permitiram que se chegasse a várias conclusões relevantes em estudos de sobrevivência. A expressão dos RE foi considerada um fator independente de prognóstico para o TLD (Rutteman et al., 1988; Morris et al., 1998; Sartin et al., 1992; Nieto et al., 2000; De las Mulas et al., 2005) e o TS (Sartin *et al.*, 1992; Nieto et al., 2000; De las Mulas et al., 2005; Chang et al., 2009, Sleenckx et al., 2011). A mesma avaliação considerando os RP de forma independente resultou em conclusões antagónicas em vários estudos, pelo que o valor de RP como fator de prognóstico independente ainda é incerto (De las Mulas et al., 2005; Ferreira et al., 2009).

II 8.10.3 Marcadores basais – Citoqueratinas 5/6

As citoqueratinas são filamentos intermediários proteicos (a cuja família, além das citoqueratinas, pertencem a vimentina, a desmina e o neurofilamento) (Arai et al., 1994) típicos

de epitélios, essenciais para a estrutura e função dos tecidos normais, que revelam uma distribuição tecidual restrita (Dairkee, Ljung, Smith & Hackett, 1987). Para além de serem dos principais componentes do citoesqueleto, são muito dinâmicas e estão envolvidas nas vias de sinalização intracelular (Dairkee et al., 1987; Moll, Divo & Langbein, 2008), sendo marcadores muito sensíveis para a deteção de células malignas de origem epitelial e constituindo-se como uma das formas mais importantes de classificar tumores de origem desconhecida (Zuccari et al., 2004b). Apesar de serem possíveis algumas modulações ao longo do processo da carcinogénese (Laakso, Loman, Borg & Isola, 2005), o facto de estes filamentos intermediários serem extremamente estáveis e de existir uma grande conservação nas características dos padrões de citoqueratinas ao longo do desenvolvimento tumoral possibilitou em muito o estudo e a caracterização da histogénese tumoral, sendo nesse contexto que as citoqueratinas começaram por ser mais exaustivamente estudadas (Malzahn, Mitze, Thoenes & Moll, 1998). A maior parte dos estudos existentes sobre estas proteínas são, naturalmente, respeitantes à biologia humana, e a progressão no conhecimento destas veio trazer consecutivas conclusões e construções heurísticas que desmontaram, sucessivamente, vários paradigmas relacionados com o tecido glandular mamário, tanto a nível molecular como estrutural e fisiológico, iniciando-se na histogénese, continuando-se na carcinogénese, e tendo atualmente um reconhecido valor prognóstico. Muitos conceitos foram adotados, adaptados, descartados, e continuam a existir, na literatura, definições catacrísticas (como o termo “basal”), precisamente pela constante reconstrução e remodelação destes.

As citoqueratinas humanas têm um grau enorme de diversidade (incluindo 54 elementos distintos) e são classificadas de acordo com o seu tipo e ponto isoelétrico (ácidas ou básicas-neutras) e a massa molecular (baixa ou elevada) (Moll et al., 2008). As de elevada massa molecular (CK5, CK14, CK17) expressam-se preferencialmente nos epitélios estratificados, tais como os epidermóides ou escamosos, enquanto as de baixo peso molecular (CK8, CK18) se expressam principalmente nos epitélios simples, como os glandulares. Esta característica faz com que as primeiras se expressem preferencialmente em carcinomas escamosos ou espinocelulares e as segundas em adenocarcinomas.

A partir das 28 semanas de vida intrauterina humana, a glândula mamária passa a ser constituída por duas camadas de células, uma população celular interna luminal e uma camada externa, justaposta à membrana basal, comumente denominada camada basal (Malzahn et al, 1998). Apesar do sistema ductal mamário ser caracterizado por áreas de grande heterogeneidade a nível morfológico e funcional, esta arquitectura pode ser considerada transversal a todo o tecido glandular mamário, do mamilo às unidades terminais ductais. Heterogénea também, em termos morfológicos (células cubóides ou fusiformes) é a camada basal em si, dependendo da

localização na “árvore” ductal ou do estado reprodutivo. Estas células podem ser distinguidas das células basais típicas dos epitélios estratificados pelo facto de apresentarem várias características das células musculares lisas (razão pela qual se passaram a designar mioepiteliais) (Gusterson et al., 2005).

O termo “basal” para se referir a determinada população celular surgiu dos trabalhos de Moll e colegas (1982, 1983). Em 1982, quando iniciou o seu estudo sobre as citoqueratinas, além de descrever o “catálogo” de citoqueratinas humanas em cultura de células, epitélios normais e tumores, identificou dois grupos principais de cancros da mama, pelas diferenças a nível de expressão destas: simples ou estratificadas. Posteriormente (Moll, Krepler, & Frank, 1983), a análise desta expressão em tumores e no epitélio normal associado veio a confirmar a existência de um pequeno subgrupo de tumores mamários com expressão das CK estratificadas, incluindo as 5, 14 e 17. Com o aumento da disponibilidade de anticorpos mais específicos para cada citoqueratina, a identificação da sua distribuição a nível celular tornou-se mais fácil. Percebeu-se então que as citoqueratinas estratificadas de elevado peso molecular (CK5 e CK14) que formavam complexos *in vivo* eram expressas nas células basais de epitélios estratificados, passando então a ser conhecidas como “citoqueratinas basais”. Em muitos tecidos glandulares estas CK foram encontradas expressas em células adjacentes à membrana basal, passando a posição das células e a sua expressão destas queratinas a designar a mesma população de células, sendo que por vezes o termo “basal” passou a designar as células mais quanto à expressão das CK que quanto à sua posição de adjacência à membrana basal. Esta terminologia algo catacréstica trouxe alguma confusão quando aplicada ao estudo de tumores mamários por modelos experimentais no estudo da origem celular, quer por em culturas de tecidos se poderem modular alterações nas expressões dos filamentos intermediários quer por as expressões das CK5 e CK14 não serem restritas às células mioepiteliais (podendo, contraintuitivamente, ser encontradas tanto numa localização luminal como basal das glândulas normais) (Malzahn et al., 1998; Gusterson, Ross, Heath & Stein, 2005; Eerola et al, 2008). Várias publicações evidenciam claramente a marcação de células luminiais em ductos e particularmente nos complexos ULTD (Gusterson et al., 2005). Em estudos nos quais se avaliou a expressão destas citoqueratinas (CK5, 14 e 17) em tecidos mamários normais de mulher utilizando determinados reagentes, verificou-se a existência de variações significativas, quer dentro da mesma mama quer entre mamas diferentes: havendo alguns lóbulos totalmente negativos, outros mostravam ocasionalmente células marcadas. A grande maioria da marcação ocorria nas células da camada luminal, verificando-se uma marcação muito ténue das mioepiteliais. Baseando agora o estudo em carcinomas *in situ*, com os mesmos reagentes, foi demonstrada uma positividade muito clara nas células mioepiteliais, associadas ao crescimento e malignidade (Gusterson et al., 2005).

Temos portanto que, sendo as citoqueratinas CK8 e CK18 expressas exclusivamente em células luminais, o termo basal parece definir um conjunto de células que podem ou não pertencer a essa camada (Malzahn et al., 1998). Outros estudos haviam já demonstrado uma “troca” na marcação das células luminais para as mioepiteliais, numa outra proteína considerada parte da “assinatura” basal, a anexina VIII (Gusterson et al., 2005).

Este paradigma dos dois tipos celulares (luminal/basal) ajudou a compreender e modelar com sucesso, ao longo de muitas décadas, o nosso conhecimento de processos patológicos na mama humana. No entanto, com o decorrer do tempo e desenvolvimento de estudos, foram existindo crescentes evidências científicas a demonstrar que este modelo é demasiado simplista e que a mama tem uma estrutura celular mais complexa, com um sistema integrado de renovação celular epitelial. Vários estudos (O’Hare, Ormerod, Monaghan, Lane & Gusterson, 1991; Péchoux, Gudjonsson, Ronnov-Jessen, Bissell & Petersen, 1999; Boecker et al., 2002a; Boecker et al., 2002b) permitiram chegar à conclusão de que não só a CK5 é um marcador celular mioepitelial mas também um *marcador de células progenitoras* nas neoplasias mamárias. De acordo com este modelo, as células positivas às CK5 são células progenitoras adultas que passam por transições de células intermédias caracterizadas por uma duplicidade (CK5+/CK18/8+ ou CK5+/SMA+) para produzir células luminais secretórias completamente diferenciadas (CK18/8+) e mioepiteliais (SMA+).

Ramalho (2006), com base nos trabalhos de Lacroix-Triki et al. (2003), considera na glândula mamária normal 2 camadas celulares com 3 populações de células distintas: camada luminal, composta tanto por células glandulares epiteliais (identificadas pelas CK 7, 8, 18 e 19) como por células epiteliais basais (identificadas pelas citoqueratinas 5, 14 e 17 mas não pela SMA- α) e a camada basal, composta por células mioepiteliais (identificadas pelas citoqueratinas 5, 14, 17, SMA- α e p63). Nas neoplasias mamárias estes três tipos celulares podem estar limitados a um ou dois, caracterizando tipos particulares de neoplasias (Abd El-Rehim et al, 2004). Este autor dedicou-se ao estudo da expressão de p63 e CK5 em tumores mamários mistos na cadela, verificando a existência da sua coexpressão em células fusiformes da componente mesenquimatosa de tumores benignos mistos e carcinomas em tumores benignos mistos, o que reforçou a hipótese de uma origem mioepitelial da componente mesenquimatosa em tumores mistos na cadela. As células epiteliais basais foram também marcadas pela CK5 mas não pela p63, reiterando que aquela pode não ser um marcador exclusivamente mioepitelial mas também basal em tumores caninos mistos. Também de acordo com estes dados, as células epiteliais basais podem estar relacionadas com a origem da componente epitelial dos tumores mistos na glândula mamária canina. Em conclusão, como os três tipos fenotípicos celulares observados

em glândulas mamárias normais podem ser perdidos e convertidos em novos fenótipos aquando da transformação tumoral, eles podem ou não apresentar o teu perfil de expressão original.

Uma das diferenças entre os cancros de mama na mulher e na cadela é a maior frequência de diferenciação mesenquimatosa nestas últimas. É possível que no cancro da mama, na mulher, o fenótipo basal preserve um imunoperfil mioepitelial em contraste com os tumores mistos da glândula mamária canina, nos quais o p63 representa uma origem mioepitelial do componente mesenquimal, podendo a componente epitelial originar-se de células epiteliais basais que exibem a expressão de CK5. Os tumores mistos da glândula mamária canina podem apresentar componentes originados de células tronco comuns com uma capacidade de diferenciação divergente maior do que acontece no cancro da mama na mulher (Ramalho et al., 2006).

O valor prognóstico das citoqueratinas pode ser avaliado tanto de uma forma isolada como de uma forma integrada à nova abordagem (molecular) de classificação dos tumores mamários. Foi inicialmente demonstrado por Perou e colegas (2000) que a diversidade fenotípica dos tumores mamários se refletia numa variação sistemática correspondente em padrões de expressão génica (Perou et al., 2000, Sorlie et al., 2001), verificando-se posteriormente a existência de um grupo de tumores mamários cuja assinatura de expressão génica incluía uma elevada expressão das queratinas basais CK5 e CK17 (Nielsen, Hsu & Jensen et al., 2004; Carey et al., 2006; Cheang et al., 2008; Cheang et al., 2009). Estudos posteriores (Nielsen et al., 2004; Cheang et al., 2008) vieram a identificar uma elevada especificidade e sensibilidade na identificação deste tipo de tumores (denominados basais) com a inclusão de CK5/6 e HER1 ao painel de marcadores (RE, RP e HER-2) que permitia distinguir os restantes subtipos. O subtipo molecular identificado foi considerado um fator independente de prognóstico desfavorável nestes estudos. Já bastantes anos antes da descoberta dos *carcinomas de tipo basal* (por análise de *microarrays* de expressão génica), havia sido sugerido que certas proteínas constituintes dos filamentos intermédios do citoesqueleto podiam ser de relevância para o comportamento e prognóstico de carcinomas mamários humanos sendo, concretamente, a imunoexpressão de citoqueratinas basais associada, já em 1987 (Dairkee et al., 1987b) a um mau prognóstico, pela verificação de recorrência precoce e baixo tempo de sobrevivência (Malzahn et al., 1998; Van de Rijn et al., 2002; Sotiriou et al., 2003; Abd El-Rehim et al., 2004, Adriance et al., 2005; Eerola et al., 2008). A marcação positiva para as CK5/6 afirmou-se, isoladamente, a partir de estudos de análise multivariada (Van de Rijn et al., 2002; Abd El-Rehim et al., 2004), como fator independente de mau prognóstico. Sobre a expressão de citoqueratinas em tumores mamários caninos só mais recentemente foram surgindo mais estudos. Griffey et al. (1993) havia contudo, já nesta altura, descrito um fenótipo basal para os carcinomas mamários caninos, caracterizado igualmente pela agressividade do comportamento clínico. Desde os eventos que

permitiram uma imunofenotipagem molecular dos tumores (que vieram permitir uma separação e classificação em grupos com assinaturas génicas e moleculares cada vez mais consistentes), os estudos de prognóstico ofereceram, de alguma forma, a primazia aos grupos moleculares em detrimento de cada um dos seus marcadores. Nesse sentido, o valor prognóstico das citoqueratinas aparece mais dentro dessa integração que isoladamente. Ainda assim, pela importância de que se revestem, existem alguns dados sobre as associações ou interdependências com a expressão de outros marcadores ou a sua relação com variáveis clínicas ou histopatológicas. No sentido da imunoexpressão isolada das citoqueratinas em cadela, os resultados são altamente divergentes. No estudo de Gama et al. (2008a) a sobre-expressão de CK5 verificou-se em 32,4% dos 102 carcinomas analisados, no estudo de Sassi (2010) em 10% dos 45 carcinomas verificou-se a sobre-expressão de CK5/6 e/ou CK14 e, finalmente, nos estudos de ORPHEO (2014), a sobre-expressão de CK5/6 foi contabilizada em 65% dos 350 carcinomas mamários. De vários estudos resultou a confirmação de os tumores imunoativos a CK5/6 serem na generalidade negativos para os recetores hormonais (RE e RP) na mulher (Malzahn et al., 1998; Abd El-Rehim et al., 2004; Nielsen et al., 2004; Eerola et al., 2008) formando um grupo distinto daqueles que seriam mais imunoativos ao HER-2 (Korsching et al., 2002; Nielsen et al., 2004). Verificou-se igualmente uma associação em sentido direto desta sobre-expressão com a de p53, EGFR e o índice proliferativo por Ki-67 (Malzahn et al., 1998; Korsching et al., 2002). Eerola (2008), além de confirmar estas associações nos seus estudos, verificou que a expressão das CK 5/6 está associada significativamente ao grau histológico de malignidade, corroborando resultados anteriores (Malzahn et al., 1998; Van de Rijn et al., 2002) em que as citoqueratinas simples foram associadas a graus histológicos de malignidade de I e II e as estratificadas a grau III.

II 8.10.4 Família EGFR

II 8.10.4.1 HER-2

A família dos recetores do fator de crescimento epidérmico (EGFR) é composta por quatro proteínas transmembranares (HER-1, HER-2, HER-3 e HER-4) que apresentam atividade tirosina-cinase (Holbro & Hynes, 2004). Estas podem encontrar-se sob a forma de monómeros ou dímeros, correspondendo a dimerização ao seu estado ativo (Gutierrez & Schiff, 2011). Para a ativação do recetor é necessária a união de um ligando ao seu domínio extracelular ou, no caso do recetor HER-2 (para o qual não existe um ligando específico) a heterodimerização com outro membro da família EGFR ou a homodimerização. Vários fatores concorrem para a

importância do HER-2 nesta família: a homodimerização ocorre espontaneamente quando o nível de expressão do HER-2 é elevado, na heterodimerização o HER-2 é o par preferencialmente escolhido e o HER-2 é o membro da família que tem uma maior atividade de tirosina-cinase, conseguindo os dímeros do qual faz parte gerar os sinais intracelulares mais intensos (Yarden, 2001). As vias de sinalização melhor caracterizadas são a Ras-MAPK, PI3K-PKB/Akt e a PLC-PKC. Os fatores de transcrição ativados por estas vias são responsáveis pela regulação de vários genes envolvidos em processos celulares importantes em diferentes tecidos, nomeadamente a divisão, migração, adesão, angiogénese, diferenciação e apoptose (Coussens et al., 1985). Sendo de relevância no contexto do desenvolvimento de tecido mamário normal é-o também no desenvolvimento e progressão de neoplasias mamárias.

O HER-2 (c-erbB-2) foi dos primeiros proto-oncogenes estudados em amostras de tumores mamários invasivos humanos. A sua importância inicial como fator de prognóstico acabou por ser ultrapassada pelo papel-chave como fator preditivo da resposta a determinadas terapêuticas, nomeadamente ao trastuzumab (Herceptin™), um anticorpo monoclonal humanizado que mostrou em vários estudos melhorar as taxas de resposta, tempo de progressão e sobrevivência total à doença (Slamon et al., 2001; Romond et al., 2005; Smith et al., 2007). Nos tumores mamários invasivos, a amplificação génica é o mecanismo predominante (85 a 90%) pela sobre-expressão do gene (Hoang, Sahin, Ordóñez & Sneige, 2000; Jimenez, Wallis, Tabaszka & Visscher, 2000), tendo-se determinado que, para a mulher, a amplificação ou sobre-expressão existe em 20 a 30% de todos os tumores mamários, relacionando-se com uma menor sobrevivência, um menor período livre de doença e um pior prognóstico (Reis-Filho & Pusztai, 2011; Wolff et al., 2007). Em relação aos tumores em si, os que sobre-expressam HER-2 foram associados a maior grau de malignidade, maior taxa de proliferação e diminuição da expressão de recetores hormonais, verificando-se uma maior resistência à terapia endócrina (Gutierrez et al., 2011) e à quimioterapia. Foram também associados a um comportamento mais invasivo e à formação de metástases (Ahn & Vogel, 2012).

Em tumores mamários caninos, a avaliação da sobre-expressão de HER-2, por quantificação de transcrito específico de ARN mensageiro, permitiu verificar um aumento deste em 74% dos carcinomas malignos (Ahern et al., 1996). A sobre-expressão proteica foi também detetada por imunohistoquímica em TMC, embora os valores de sobre-expressão sejam muito díspares (entre 8,3% [Gama et al., 2008^a] e 40% [Singer et al., 2012]). Também em tumores benignos a sobre-expressão foi detetada, nomeadamente por Rungsipipat (1999) e Ressel (2013), com 50% de 32 tumores mamários benignos a manifestarem esta sobre-expressão no primeiro caso e 27.3% de 11 tumores no segundo. A disparidade de valores pode dever-se, como justificado pelos autores, à falta de standardização na metodologia de preparação das amostras, a

diferenças nas técnicas imunohistoquímicas e nos métodos de avaliação dos resultados, assim como às diferenças nas dimensões de amostra. Quanto à amplificação do oncogene, Ahern (1996) e Rungsipat (1999) conseguiram demonstrar a sua existência, ao contrário de De las Mulas que, em 2003, não obteve qualquer sucesso, usando a hibridização *in situ* (CISH). Apesar do reconhecimento como fator de prognóstico negativo nos tumores mamários humanos (Slamon *et al.*, 1987; Révillion, Bonnetterre & Peyrat, 1998; Rungsipat *et al.*, 1999; Dawood *et al.*, 2009), o significado da sobre-expressão de HER-2 em cães ainda é incerto. Como tal, continuam a ser necessários mais estudos, com amostras de maiores dimensões, com uma maior standardização das técnicas de deteção e nos critérios de classificação destes tumores. Podemos, ainda assim, considerar aquilo que cada um dos trabalhos realizados nos oferece, para que nos possamos aproximar de um conhecimento mais realístico desta afeção nesta espécie. Em vários estudos, os tumores classificados como HER-2 positivos foram associados a indicadores de mau prognóstico. Ahern *et al.* (1996), pela avaliação de sobre-expressão por análise de transcrito específico de ARNm, encontrou uma correlação entre esta e o diagnóstico histopatológico de malignidade, apesar de não ter encontrado relação com a invasão local ou doença metastática regional. Também Dutra (2004) encontrou uma correlação muito significativa entre a expressão de HER-2 e o grau histológico, a contagem mitótica e o pleomorfismo nuclear, associando-a à agressividade tumoral em termos proliferativos. A mesma correlação com o grau histológico foi corroborada nos resultados de De las Mulas (2003), que concluiu que os tumores positivos a HER-2 apresentavam características já estabelecidas como indicadoras de mau prognóstico, como maiores dimensões, grau histológico III, crescimento de tipo invasivo, tipo histológico simples e ausência de recetores hormonais esteroides, bem como um TLD muito curto (inferior a 6 meses). No contexto de uma aplicação da classificação dos tumores de mama da mulher, considerando a fenotipagem molecular, à espécie canina, Gama *et al.* (2008a) chegaram a algumas conclusões sobre o valor prognóstico dos tumores considerados HER-2 positivos, relacionando-os com outros fatores de prognóstico e estabelecendo comparações com os restantes subtipos moleculares a esse nível. Assim, estes tumores foram associados ao tipo histológico simples ou a carcinossarcomas e a elevados índices proliferativos. Neste estudo todos os tumores com sobre-expressão de HER-2 apresentavam expressão de pelo menos um dos marcadores basais em estudo (CK5, p63 e Pcaderina), enquanto os tumores incluídos no subtipo Basal expressavam, na sua grande maioria, pelo menos dois desses marcadores. Este facto vai de encontro à sugestão, por parte de autores de alguns estudos, de que possivelmente os tumores HER-2 serão uma subclasse de tumores do subtipo Basal, de prognóstico semelhante. Os tumores HER-2 positivos surgiram neste estudo sempre associados a um prognóstico de alguma forma intermédio entre os

Luminais e os Basais. No entanto, a análise das curvas de sobrevivência de Kaplan – Meier veio contrariar a tendência das restantes variáveis analisadas, já que os tumores com sobre-expressão de HER-2 se mostram associados a TLD e TS significativamente superiores aos do subtipo Basal, quando estes se esperavam semelhantes para os dois grupos. Outros estudos realizados neste âmbito revelaram resultados que vieram antagonizar-se com os supracitados, verificando-se um prognóstico mais favorável nos animais com sobre-expressão de HER-2, sendo o período de sobrevivência maior nestes do que nos que apresentavam uma expressão normal deste marcador (Hsu, Huang, Liao, Wong & Chang, 2009).

Neste momento, podemos afirmar que os estudos existentes são ainda insuficientes para a definição do verdadeiro valor prognóstico deste proto-oncogene nos tumores mamários caninos.

II 8.10.4.2 HER-1

O recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), também conhecido como HER-1, foi o primeiro recetor transmembranário com atividade de tirosina-cinase a ser relacionado com o cancro humano (Hynes & Lane, 2005) e a sua expressão na mama normal e na neoplásica tem sido extensivamente estudada, dada a importância do seu papel no desenvolvimento mamário normal e na lactação. Estudos recentes mostram que a sua expressão é frequente (Nielsen *et al.*, 2004; Livasy *et al.*, 2006; Reis-Filho *et al.*, 2006; Turner & Reis-Filho, 2006) nas células basais mioepiteliais, tendo sido considerado por alguns autores um possível marcador destas (Korsching *et al.*, 2002; Nielsen *et al.*, 2004). Apesar das variações existentes nos estudos quanto à metodologia e critérios de positividade, os resultados apontam para uma sobre-expressão de EGFR em aproximadamente 16-48% dos tumores mamários humanos (Toi, Tominaga, Osaki & Toge, 1994; Tsutsui, Ohno, Murakami, Hachitanda & Oda, 2002; Rampaul *et al.*, 2005). Esta sobre-expressão foi já associada a propriedades biológicas agressivas e a um mau prognóstico clínico (Nicholson *et al.*, 1990; Tsutsui *et al.*, 2002; Tovey *et al.*, 2004), embora a sua validade como ferramenta isolada de prognóstico na mulher ainda seja incerta (Nicholson *et al.*, 2001; Rampaul *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2007). Em contraste com a abundância de literatura relacionada com os tumores mamários humanos (Klijn *et al.*, 1992; Bhargava *et al.*, 2005; Reis Filho *et al.*, 2005 e 2006; Park *et al.*, 2007), o número de estudos disponíveis sobre o *status* de EGFR em tecidos mamários caninos é ainda bastante limitado (Rutteman *et al.*, 1990; Donnay *et al.*, 1993; Rutteman *et al.*, 1994; Donnay *et al.*, 1996). Nos estudos referidos não se conseguiu encontrar associações significativas entre as concentrações de EGFR

e outras variáveis clinicopatológicas. Em alguns estudos foi encontrada uma associação inversa entre a sobre-expressão deste recetor e os recetores de estrogénio (Nerurkar *et al.*, 1987), enquanto noutros se encontrou uma correlação positiva (Donnay *et al.*, 1993; Donnay *et al.*, 1996) ou nenhuma tendência (Rutteman *et al.*, 1994; Santini *et al.*, 2002). Em 2009, num estudo de Gama *et al.* (2009) que pretendeu comparar carcinomas mamários caninos com tumores benignos, a expressão de EGFR foi correlacionada significativamente com a malignidade em termos histológicos, o tamanho do tumor e a idade do animal, sendo também associada a uma diminuição de TLD e TS, embora aqui não significativamente em termos estatísticos.

II 8.11 BRCA1/ BRCA2, p53 e p63

As mutações nos genes supressores tumorais *BRCA1* (*breast cancer type 1*) e *BRCA2* (*breast cancer type 2*) têm sido associadas a tumores mamários malignos de forte componente hereditária na mulher (Hall *et al.*, 1990; Narod *et al.*, 1991; Easton *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1998). Estes genes desempenham um papel importante na manutenção da estabilidade genómica. O *BRCA1* está também envolvido na reparação do ADN sendo um *checkpoint* do ciclo celular e um regulador da duplicação centrossómica (Deng & Scott, 2000). A perda destas funções secundariamente à mutação deste gene leva à instabilidade genética bem como à inativação do gene *p53*, eventualmente iniciando um processo de tumorigénese (Deng *et al.*, 2000). Em tumores mamários da espécie canina os estudos das mutações *BRCA* têm sido limitados à expressão génica e os resultados têm encontrado algumas variações. As mutações em linhas germinais, tanto de *BRCA1* como de *BRCA2* têm sido associadas a um aumento do risco tumoral nos *English Springer Spaniels* (Egenvall *et al.*, 2005; Rivera *et al.*, 2009). Em alguns estudos foi identificada a subexpressão de *BRCA1* em TMC (Nieto *et al.*, 2003) e noutros foi detetada a sobre-expressão de *BRCA2* em tumores metastáticos (Nieto *et al.*, 2003; Klopfleisch & Gruber, 2009). Hsu (2009) não observou variações significativas entre o TS e a variação genética no gene *BRCA2* mas as associações entre as características clinicopatológicas e uma variação no exão 11 deste gene sugeriram que estas parecem mais frequentes em tecido tumoral mamário que no tecido normal. Yoshikawa (2015) demonstrou no seu estudo que os níveis de transcritos de ARNm do *BRCA2* canino estão significativamente reduzidos em amostras tumorais em relação ao tecido mamário normal, adiantando hipóteses para a forma como a baixa expressão de *BRCA2* leva ao desenvolvimento tumoral nas cadelas. A perda da expressão imunohistoquímica de *BRCA1* não foi correlacionada de forma significativa com o TLD ou TS (Nieto *et al.*, 2003). No entanto, verificaram-se correlações com marcadores

indiretos de malignidade como pobre diferenciação tubular, elevado índice mitótico, elevado índice de pleomorfismo nuclear, elevado índice proliferativo (Ki-67) e ausência de recetores de estrogénio (Nieto et al., 2003).

O *p53* é um gene supressor tumoral responsável pelo controlo do crescimento celular após a ocorrência de alterações no ADN (Queiroga et al., 2011), estando as suas mutações directamente implicadas na formação de neoplasias, seu crescimento e progressão (Velculescu & El-Deiry, 1996). Estas mutações têm sido identificadas como das alterações genéticas mais comuns na carcinogénese (Gamblin, Sagartz & Couto, 1997; Zchetti, van Garderen & Rutteman, 2007). Nos tumores da mama estas mutações têm valor prognóstico e estão altamente correlacionadas com baixas taxas de sobrevivência (Kim et al., 2010) tanto na mulher como na cadela, desempenhando também, nas duas espécies, um papel importante a nível da carcinogénese (Muto et al., 2000; Wakui et al., 2001; Lee & Kweon, 2002; Lee et al., 2004). Sabe-se que os genes *BRCA1* e *p53* trabalham cooperativamente na indução de apoptose nas células cancerígenas (Zhang et al., 1998) e, nas cadelas que apresentam tumores mamários, foi encontrado um aumento da expressão de *p53* associado à sobre-expressão de *BRCA1* (Nieto et al., 2003). A frequência de mutações neste gene em carcinomas mamários caninos (20%) é semelhante à observada na mulher (Lee et al., 2004; Kim et al., 2010).

O *p63* é um gene pertencente à família do gene *p53* que, apesar de não se considerar unanimemente um gene supressor tumoral, está envolvido na regeneração das células tronco, (Queiroga et al., 2011) estando implicado em funções celulares que vão desde a apoptose à diferenciação celular (Ramalho et al., 2006). Pelo seu papel como marcador de células tronco e mioepiteliais, tem sido extensamente estudado no âmbito da histogénese de neoplasias humanas e TMC (Gama et al., 2003), tendo-se verificado a sobre-expressão em vários tipos de tumores mamários (particularmente em células epiteliais basais), e não se descartando a possibilidade de agir como promotor tumoral sob determinadas condições patológicas (Queiroga et al., 2011). Em humanos encontra-se sobre-expresso no fenótipo basal dos carcinomas mamários, o que suporta o seu papel na diferenciação e controlo de crescimento em epitélios estratificados (Queiroga et al., 2011).

II 8.12 Cox-2

Alguns estudos correlacionam a elevada expressão da ciclooxigenase-2 (Cox-2) com a malignidade histológica, o aumento da capacidade proliferativa das células neoplásicas, a diminuição da taxa apoptótica e a neovascularização, fatores favoráveis ao desenvolvimento do

potencial das células tumorais, estando também inversamente relacionada com a sobrevivência (Ferguson, 1985; Nieto et al., 2000; Lavalle et al., 2009).

II 8.13 Subtipos moleculares- Uma nova classificação

II 8.13.1 Classificação molecular na mulher

No capítulo respeitante à carcinogénese, o que primeiramente se tentou enfatizar para a compreensão do processo foi a importância de abandonar a perspectiva de o cancro se tratar de uma doença apenas. Historicamente, o cancro de mama na mulher foi considerado uma doença singular, apesar de com evidentes variações a nível de características histopatológicas e de respostas a tratamentos sistémicos (Reis-Filho & Pusztai, 2011). A sua heterogeneidade compreende numerosas entidades distintas com características biológicas diversas e correspondente diversidade a nível de comportamentos clínicos (Weigelt & Reis-Filho, 2009; Weigelt, Baehner & Reis-Filho, 2010; Weigelt, Geyer & Reis-Filho, 2010) evidenciando uma multiplicidade de doenças. As diferenças entre elas, afetando o mesmo órgão anatómico, incluem fatores de risco, apresentações clínicas, características patológicas, respostas a terapias e desfechos clínicos (Weigelt et al., 2010b). Para além da heterogeneidade entre pacientes ou entre tumores, a heterogeneidade intratumoral traz um incremento a esta complexidade, que se deve à diversidade subclonal resultante de variações a níveis genéticos e epigenéticos, expressão de marcadores proteicos e estados de diferenciação entre diferentes subpopulações celulares (Norum, Andersen & Sorlie, 2014; Staaf & Ringnér, 2015). Este tipo de heterogeneidade inclui ainda o microambiente e a diversidade das populações celulares que refletem níveis múltiplos de envolvimento de vários processos biológicos, tais como a angiogénese e resposta imune (Staaf et al., 2015).

Foi nos anos 70 que, pela primeira vez, o cancro da mama começou a ser dividido em dois grupos, pela perceção da distinção de características clínicas de cada um dependendo da expressão de recetores de estrogénio (RE) (Reis-Filho et al., 2011). Já em 1985, a publicação do trabalho de Coussens et al. (1985) revelou a identificação do oncogene *Neu* (c-erbB-2), e rapidamente se percebeu a sua importância como fator de prognóstico e potencial alvo de imunodiagnóstico e imunoterapia (Maguire & Greene 1989; Maguire & Greene, 1990; Toyoshima, 1990). Anteriormente, a avaliação dos tumores mamários de acordo com o grau e tipo histológico havia vindo a permitir a utilização de algoritmos de prognóstico e a determinação e adequação de terapêuticas *per se* (Mook et al., 2009; Schmidt et al., 2009). Com as ferramentas disponíveis, a frustração gerada pela evidência de inadequação de tratamentos

às pacientes e a existência de uma larga margem de imprevisibilidade de resposta a esses tratamentos terá servido como motor para o progresso no entendimento desta doença, tão devastadora e tão indesejável ainda.

As decisões de tratamento são ainda muito baseadas em critérios histopatológicos “clássicos” como o tamanho do tumor, o grau e tipo histológico, o envolvimento metastático dos linfonodos, a infiltração linfoide, mas cada vez mais se foi alargando o espectro de critérios a avaliar, como a expressão de recetores de estrogénio, progesterona e do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER-2). Estes parâmetros foram desde sempre incorporados nas *Guidelines* de St. Gallen (Goldhirsch et al., 2009; Goldhirsch et al., 2011; Curigliano et al., 2013; Goldhirsch et al., 2013; Untch et al., 2013), destinadas a fornecer recomendações racionais para personalizar a abordagem terapêutica em cada paciente (Schmidt et al., 2009).

Foi na viragem do século que, com a publicação de estudos seminais relativos à identificação de perfis de expressão genética baseados em técnicas de *microarray* (Perou et al., 2000, Sorlie et al., 2001), se assistiu a uma mudança de paradigma, com a redescoberta da complexidade e heterogeneidade dos tumores mamários a um nível molecular (Colombo, Milanezi, Wiegelt & Reis-Filho, 2011). Esta mudança conceptual veio trazer uma nova forma de estratificar os pacientes para a escolha de decisão terapêutica (Pusztai et al., 2008), deixando de considerar como determinantes os fatores de prognóstico anatómicos mas antes as características moleculares intrínsecas dos tumores, e de uma forma mais integrada (Reis-Filho et al., 2010; Weigelt et al., 2010). No primeiro trabalho relativo ao estabelecimento dos “retratos” moleculares de cancros mamários humanos, Perou et al. (2000) começou por partir do pressuposto de que a diversidade fenotípica deveria ser acompanhada por uma diversidade correspondente de expressão de padrões de genes, e que este conhecimento permitiria estabelecer uma base para uma nova e melhorada taxonomia dos tumores mamários. Foi realizada a análise por *microarray* de ADNc a diversos tecidos mamários de diagnósticos histopatológicos variados e definida uma lista de genes “intrínsecos” (genes que variavam maioritariamente entre tumores de pacientes diferentes ao invés dos que variavam dentro dos mesmos tumores ou mesmo paciente) agrupando-os por um método hierárquico de agrupamento, baseado na similaridade do padrão com que a sua expressão variava no conjunto das amostras. Desta forma chegou-se a três conclusões ou evidências principais. Primeiro, que os tumores mostram grandes variações nos seus padrões de expressão genética. Segundo, que esta variação é multidimensional, isto é, há padrões independentes de variações em diferentes grupos de genes. Terceiro, que estes padrões manifestam uma ordem pervasiva que reflete as relações entre os genes, as relações entre os tumores e conexões entre genes específicos e tumores específicos. Além de reveladas novas similaridades e diferenças dentro dos tumores,

esta revelação de “retratos” moleculares veio abrir caminho a novas interpretações a nível biológico (Perou et al., 2000). As correspondências encontradas entre os níveis de expressão dos genes selecionados e as características tumorais que se sabia estarem de alguma forma relacionadas com alguns deles e, em geral, com os restantes genes do grupo a que pertenciam, vieram validar os dados do estudo. Da análise à expressão dos referidos genes “intrínsecos” resultou uma divisão surpreendente das amostras em dois subgrupos principais, sendo que os dois ramos do dendrograma as separavam em tumores que eram clinicamente descritos como RE positivos ou RE negativos (em concordância com a divisão já feita nos anos 70 com base nas características tumorais). Os tumores do grupo RE+ caracterizavam-se por uma expressão relativamente alta de vários genes expressos pelas células luminais da mama, associação esta corroborada posteriormente por análise imunohistoquímica usando anticorpos anti-queratinas luminais (CK8/18). Neste grupo, de forma geral, não se verificava sobre-expressão de HER-2. Da mesma forma, muitos dos genes característicos das células basais foram expressos em tumores que marcavam positivamente, por imunohistoquímica, as citoqueratinas basais 5/6, 17 ou ambas. Nestes, não havia a expressão de RE ou da maioria dos genes com eles coexpressos. A sobre-expressão do oncogene HER-2 mostrou-se também associada à elevada expressão de um grupo específico de genes, o que permitiu identificar um outro subtipo tumoral. Estes tumores apresentavam níveis baixos de expressão de RE e dos genes associados à sua expressão, traço que partilhavam com os tumores do tipo Basal. A partir destes dados, foram primeiramente identificados 4 grupos de tumores que poderiam estar relacionados com características moleculares distintas da biologia epitelial mamária: RE+/tipo Luminal, tipo Basal, HER-2+ e Normal, sendo que o carcinoma RE negativo incluía dois subtipos distintos de tumores, os Basais e os HER-2+. O mesmo grupo de investigadores, agora liderado por Sorlie (2001), usando os mesmos métodos de análise de amostras, veio confirmar os resultados obtidos anteriormente e, adicionalmente, pelo aumento do tamanho da amostra, a demonstrar uma subsequente divisão do grupo luminal/RE+ em pelo menos dois grupos possíveis: Luminal A e B. O primeiro apresentava uma maior expressão do gene RE- α enquanto o segundo apresentava uma expressão baixa a moderada dos genes especificamente luminais, incluindo do RE. Neste trabalho pretendeu-se também fazer correlações entre os grupos tumorais encontrados e os decursos clínicos. Os subtipos Basal e HER-2 positivo foram associados a menores TLD e TS. Em relação à sobre-expressão de HER-2, o seu valor como fator de prognóstico era já bem conhecido à data e veio a ser confirmado. Também o subtipo Basal se considerou uma entidade clínica distinta, associada a uma elevada frequência de mutações em *p53*. Descobrir que os tumores que expressavam RE eram de um prognóstico relativamente favorável, apesar de se conhecer o estradiol como um potente mitogénio nas células com

recetores positivos, veio enfatizar a problemática de correlacionar diferentes parâmetros e extrapolar o conhecimento da função biológica de um único fator para o seu valor prognóstico. Houve vários trabalhos posteriores a confirmarem estes subtipos moleculares pela mesma técnica (Sorlie et al., 2003; Hu et al., 2006). Tendo-se percebido claramente a importância da determinação dos subtipos tumorais a partir das suas características moleculares, e sendo este método original de determinação (*microarrays* de ADNc) moroso, dispendioso, e exigente quanto à necessidade de condições estandardizadas, os estudos subsequentes procuraram correlacionar estes subtipos moleculares com os subtipos imunohistoquímicos, já que para a determinação destes os métodos seriam muito mais práticos e expeditos num contexto clínico. Assim, Nielsen et al. (2004) fez uso destas técnicas para categorizar os tumores mamários, tendo especial interesse nos de subtipo Basal, testando-os para padrões proteicos característicos, examinando a sua significância por *microarrays* e fazendo uma avaliação de prognóstico. Assim, qualquer tumor positivo para HER-2 (forte coloração da membrana) seria colocado no subtipo HER-2+, qualquer tumor HER-2 negativo ou baixo e RE positivo seria colocado no subtipo Luminal, qualquer tumor simultaneamente negativo para os dois marcadores mas positivo para pelo menos um dos marcadores CK5/6 e HER-1 seria colocado no subtipo Basal e finalmente, qualquer tumor negativo para todos os 4 marcadores seria colocado no subtipo Negativo. A expressão de HER-1, não sendo este um marcador específico dos tumores Basais como as CK 5/6, pelo facto de existir em bastantes tumores Basais foi, quando combinada com a de outros marcadores, considerada de grande utilidade na identificação deste subtipo. Destes estudos resultou uma boa correlação entre o subtipo Basal por métodos imunohistoquímicos e por expressão génica, confirmando-se também por esta técnica um muito pior prognóstico que do subtipo Luminal.

Em 2006, Carey subcategorizou os subtipos definidos imunohistoquimicamente em Basal, se negativo para RE, RP e HER-2 e positivo para CK5/6 e/ou HER-1, HER-2+/RE- se negativo para RE e RP e positivo para HER-2, Luminal A se positivo para RE e/ou RP e negativo para HER-2 e Luminal B, se positivo para RE e/ou RP e HER-2. Os tumores negativos para os 5 marcadores foram considerados Não-Classificados. Aqui, foi ao grupo HER-2+/ER- que correspondeu o pior prognóstico, seguido do subtipo Basal. Os estudos diferenciam-se no facto de Nielsen ter usado exclusivamente a positividade de HER-2 para critério de inclusão no grupo “HER-2” e Carey ter considerado simultaneamente a negatividade de RE, havendo uma categoria separada para os tumores HER-2+ e RE+ (Luminal B). Considerando os estudos moleculares originais, o subtipo Luminal B consistia também da expressão simultânea dos dois marcadores moleculares.

Em 2008, Cheang et al. propuseram-se a encontrar o melhor painel de marcadores identificativos dos tumores de tipo Basal. À altura, estes eram com frequência identificados clinicamente como Triplos Negativos, pelo facto de não apresentarem marcação imunohistoquímica para RE, RP ou HER-2. Este estudo veio a confirmar, por comparação de significância de prognóstico (estudos de sobrevivência), os resultados anteriormente obtidos no estudo de Nielsen (2004) que haviam já encontrado uma especificidade de 100% e uma sensibilidade de 76% na identificação de tumores Basais com a inclusão de CK5/6 e HER1, pertencentes a uma categoria diferente dos Triplos Negativos. Tanto a sub-tipificação molecular dos tumores mamários desta forma veio a revelar-se como um fator independente de prognóstico, como a inclusão dos marcadores supracitados na identificação do subtipo Basal resultou numa identificação melhorada de um grupo de alto-risco, cujo resultado/desfecho clínico se coaduna mais intimamente com o expectável pelos perfis de expressão génica.

Em 2009, o mesmo autor partiu da classificação que identificava os 5 grupos principais Luminal A, Luminal B, HER-2 positivo, Basal e subtipo Normal, levando em linha de consideração o seu valor prognóstico e considerando, basicamente, os marcadores supracitados, para melhor identificar ou distinguir os subtipos Luminais A e B. Partindo das evidências dos tumores Luminais B corresponderem a tumores de pior prognóstico que os Luminais A, os autores consideraram a existência de uma lacuna no que dizia respeito a um consenso num painel de marcadores de expressão a serem avaliados por IHQ. Assim, mesmo considerando-se que, de facto, alguns tumores do subtipo Luminal B poderiam ser identificados pelo nível de expressão de HER-2, assumiu-se (de evidências oriundas já do primeiro estudo publicado por Perou) que o que melhor caracterizava cada um destes grupos era a “*proliferation signature*”, que incluía a maior expressão de genes como *CCNB1*, *MKI67* e *MYBL2* nos Luminais B. Dada a disponibilidade recente de anticorpos monoclonais de coelho para o Ki-67 (codificado por *MKI67*), foi proposta a utilização deste como um biomarcador de diferenciação, tentando-se chegar a um valor de *cut-off* para incluir num ou noutro grupo. O subtipo Luminal A foi então definido como RE ou RP positivo, HER-2 negativo e de baixo índice de Ki-67 (<14%); o Luminal B como RE ou RP positivo, HER-2 negativo e com elevado índice de Ki-67 (>14%). Os tumores com RE ou RP positivos e HER-2 positivos foram considerados como um terceiro grupo de Luminais (Luminal HER-2) positivo pelo facto de a eles se poder aplicar outro tipo de tratamento (direcionado naturalmente ao HER-2). Em 2011, o *12th St Gallen International Breast Cancer Conference Expert Panel* adotou uma nova abordagem para a classificação de tumores, baseada nos subtipos biológicos que tinham vindo a ser demonstrados (Goldhirsch et al., 2011) e considerando os resultados de Cheang et al. (2008, 2009). Sendo que se pretendia chegar a um consenso a nível terapêutico, esta classificação “simplificada” foi considerada

suficiente para guiar as escolhas terapêuticas. Nesse sentido, a classificação foi feita considerando apenas a determinação de RE, RP, HER-2 e Ki-67, não incluindo a de HER-1 ou CK5/6 para a classificação do subtipo Basal, considerando antes o grupo genérico “Triplo-Negativo”. Em 2013, na reunião subsequente (Goldhirsh et al, 2013; Untch et al., 2013) o mesmo grupo procedeu a algumas alterações nas *guidelines* de tratamento, mas mantendo sensivelmente a mesma classificação de acordo com a expressão de marcadores moleculares. Para a distinção IHQ dos tumores Luminais foram considerados os trabalhos de Prat et al. (2013) que havia proposto a definição dos Luminais A como RE positivos, HER-2 negativos, com um índice de Ki-67 <14% e RP > 20% (considerando-se os valores destes últimos como valores de diferenciação, quanto a taxa de expressão qualitativa elevada ou baixa, para os restantes grupos). Os luminais B são dicotomizados em dois grupos, os Luminais B-HER-2 positivos (RE positivo e HER-2 sobre-expresso ou amplificado, independentemente dos resultados quanto a Ki-67 e RP) e os Luminais B-HER-2 negativos (RE positivos, HER-2 negativos e um dos seguintes: Ki-67 elevado ou RP negativo ou baixo). Os tumores de subtipo HER-2 são definidos, coerentemente, pela sobre-expressão de HER-2 e ausência de RP e RE. Finalmente, à semelhança do que acontecia na classificação anterior, o subtipo Basal é considerado o grupo dos tumores Triplo Negativos, definindo-se pela ausência de RE e RP bem como de HER-2.

Apesar de terem sido feitas muitas alterações à classificação original de Perou (2000) e Sorlie (2001), atualmente pode-se falar consensualmente em 4 subtipos moleculares de cancro mamário (Staaf et al., 2015): Luminal A, Luminal B, HER-2 positivo e Basal. Segue-se então uma breve descrição da classificação molecular correntemente considerada na Mulher, baseada nas revisões de Eroles et al. (2012), Norum et al. (2014) e Staaf et al. (2015)

A) *Luminal A*: considerado o subtipo mais comum, representa 50-60% do total de tumores mamários. Caracteriza-se pela elevada expressão de genes ativados pelo fator de transcrição *RE*, tipicamente expressos no epitélio de revestimento do lúmen dos ductos, pela sobre-expressão dos fatores de transcrição *GATA3*, *FOXA1* e *XBPI* e das CK luminais 8 e 18. Têm uma taxa de mutação relativamente baixa mas um espectro alargado, sendo que os genes mais frequentemente mutados são *PIK3CA*, *GATA3* e *MAP3K1*. Os cromossomas são frequentemente diploides com aberrações a nível do braço cromossómico (ganho de 5, 8 e 1q e perda de 18 e 16). A ciclina D1 é frequentemente sobre-expressa. O perfil imunohistoquímico é caracterizado pela expressão de RE, RP, CK8/18 e Bcl-2, ausência de expressão de HER-2 e uma baixa taxa de proliferação celular (Ki-67 <14%). Os carcinomas lobulares *in situ* são geralmente deste subtipo assim como a maior parte dos carcinomas lobulares infiltrativos.

Geralmente o grau de malignidade é baixo e os pacientes apresentam um bom prognóstico, com uma taxa de recidiva de 27.8% (significativamente mais baixo que restantes subtipos) e um maior tempo de sobrevivência (2,2 anos). O padrão de metastização é distinto, com a maior incidência a nível ósseo (18,7%) e uma incidência no sistema nervoso central, fígado e pulmão inferior a 10%.

B) *Luminal B*: os tumores com este perfil molecular representam 10 a 20 % dos tumores mamários. Nos tumores Luminais existe um gradiente de expressão de RE e o subtipo Luminal B encontra-se na extremidade de menor expressão destes e de outros genes regulados pelo estrogénio. Estes tumores são mais proliferativos, sendo esta a principal diferença biológica entre este subtipo e o Luminal A, com um aumento acentuado da expressão de genes de proliferação (Ki-67, Ciclina B1) e, numa proporção destes, também da expressão de EGFR e de HER-2. A aneuploidia é mais frequente, sendo frequentes também as mutações nos genes *p53* e *PIK3CA* assim como alterações que afetam as vias de *MAPK*. O perfil imunohistoquímico caracteriza-se pela expressão de RE e ausência de expressão de HER-2 (semelhante a Luminal A mas com o Ki-67 > 14% a diferenciá-los) ou expressão conjunta de RE e HER-2.

Os tumores Luminais B caracterizam um fenótipo de pior prognóstico. O TS médio após a recidiva é de 1,6 anos sendo os locais mais comuns de metastização os ossos (30%) e o fígado (13,8%).

C) *HER-2-positivo*: corresponde a 15 - 20% dos tumores mamários malignos. Caracterizam-se por uma elevada expressão do oncogene *HER-2* assim como outros genes associados às vias de HER-2, incluindo *GRB7*, *MED24* and *MED1* e genes relacionados com a proliferação celular. Morfologicamente estes tumores são altamente proliferativos, sendo que a 75% deles corresponde um grau histológico elevado e em mais de 40% existem mutações no gene *p53*. Estes tumores são tipicamente negativos para a expressão de genes epiteliais, mostrando elevados níveis de rearranjos aberrantes cromossómicos a nível do braço cromossómico 17q12. O perfil imunohistoquímico, caracterizado pela sobre-expressão de HER-2 e ausência de expressão de RE e RP, não corresponde perfeitamente ao tipo intrínseco, ou seja, apesar de a maioria (80%) dos cancros HER-2 definidos por *microarray* terem amplificação do gene ou marcação 3+ por imunohistoquímica (Rouzier et al., 2005) nem todos com amplificação de HER-2 caem no grupo HER-2+ por análise de expressão de *arrays*. Há um número significativo de tumores com amplificação do gene *HER-2* que, sendo RE positivos, caem antes no subtipo Luminal B em vez de no HER-2+ (Rouzier et al., 2005; Parker et al., 2009). De um ponto de vista clínico, este subtipo caracteriza-se por apresentar um mau prognóstico apesar de, na última

década, os tratamentos anti-HER-2 terem vindo a melhorar substancialmente a sobrevivência, tanto em casos de recorrência como nos estadios iniciais.

D) *Basal*: representa 10 a 20% do total dos tumores mamários humanos.

A designação deriva do facto de expressarem genes geralmente presentes nas células mioepiteliais do tecido mamário normal, incluindo CK5, CK17, Pcadherina, caveolina 1 e 2, nestina, CD44 e EGFR. Estes tumores têm uma taxa elevada de mutações nos genes *p53*, *BRCA1* e *BRCA2*, o que se relaciona com a maior agressividade e pior prognóstico, verificando-se também frequentemente a aneuploidia. Clinicamente, caracterizam-se pelo aparecimento a uma idade precoce, predominantemente em mulheres africanas, apresentando dimensões consideráveis à altura do diagnóstico, elevado grau de malignidade e frequência elevada de metastização regional. Tendem a ocorrer frequentemente nos carcinomas ductais infiltrativos, caracterizando-se por um elevado índice mitótico, existência de necrose tumoral, expansão de margens e uma clara resposta linfocítica estromal. O padrão metastático é muito agressivo com predominância de órgãos viscerais, principalmente pulmão, sistema nervoso e linfonodos. Uma das características mais relevantes em termos de identificação é a ausência de expressão dos três recetores chave no cancro da mama: RE, RP e HER-2, daí que seja muitas vezes designado “Triplo-Negativo”. No entanto, “Triplo-Negativos” e “Basais” não são exatamente correspondentes, verificando-se uma discordância de 30% entre estes dois grupos. Para a identificação de tumores do subtipo Basal por IHQ chegou-se à seleção de um painel de marcadores que permite classificar este subtipo com uma especificidade de 100% e uma sensibilidade de 76%. O perfil imunohistoquímico caracteriza-se por RE-, RP-, HER-2-, EGFR+ e/ou CK5/17+. O prognóstico deste subtipo é mais desfavorável que o dos Luminais, com uma taxa de recidiva muito elevada nos primeiros 3 anos.

II 8.13.1.1 Sub-tipificação molecular moderna

Em 2009, pelo uso de ferramentas estatísticas, a sub-tipificação molecular foi aperfeiçoada através da utilização de um conjunto mais pequeno de genes (50 ao invés dos 500 iniciais) para a construção de um classificador que se designou PAM50 (*Prediction of Microarray 50 genes*) (Parker et al., 2009). Foi desenvolvido igualmente um modelo de prognóstico com um *score* de risco de recorrência que utiliza a informação dos subtipos moleculares, individualmente ou articulada com informação clínica, para estimar o prognóstico ou a eficácia de quimioterapia. O PAM50 está agora disponível como uma ferramenta de estudo estandardizado chamada

Prosigna™ Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay e recebeu recentemente a aprovação da FDA (*Food and Drug Administration*) como meio de determinação do risco de recorrência aos 10 anos para as mulheres em pós-menopausa com tumores positivos para recetores hormonais em estadio I ou II da doença (com ou sem metástases nos linfonodos). O PAM50 já provou a sua superioridade como ensaio em relação aos estudos baseados em IHQ e outras ferramentas baseadas na expressão génica e continuam a ser publicados estudos que demonstram o seu impacto preditivo e de prognóstico em condições clínicas (Dowsett et al, 2013; Sestak et al., 2013; Gnant et al., 2014; Prat et al., 2014). Apesar de atualmente esta classificação ser principalmente usada como base para uma seleção terapêutica, tendo sido recentemente aprovada a comercialização desta ferramenta tanto nos Estados Unidos como na Europa, espera-se que a utilidade dos subtipos intrínsecos dos tumores mamários venha rapidamente a ter novas utilidades (Staaf et al., 2015).

II 8.13.2 Classificação molecular na cadela

Partindo das semelhanças já extensamente mencionadas ao longo desta tese entre os tumores mamários na mulher e na espécie canina, a abundância de descobertas relacionadas com a caracterização destes na mulher trouxe um novo fôlego à investigação dos tumores mamários na cadela, no sentido de verificar a robustez da comparação entre estas entidades nas duas espécies e se proceder a uma adaptação da taxonomia usada na mulher. Também no destrinçar da biologia tumoral da cadela está a base da investigação de fatores de prognóstico, novas estratégias de terapêutica e, em último caso, a abertura de novas possibilidades de desenvolvimento de estudos na área da Oncologia Comparada.

Gama et al. (2008a), com o objetivo de identificar os subtipos fenotípicos no cancro mamário canino e analisar possíveis implicações clínicas desta classificação, propôs-se a fazer uma análise imunohistoquímica a 102 casos de tumores mamários caninos baseada num painel anteriormente proposto (Matos, Dufloth, Alvarenga, Zeferino & Schmidt, 2005) de marcadores moleculares para a espécie humana: RE, HER-2, CK5, p63 e Pcaderina. A estes somou o marcador Ki-67, com o objetivo de analisar os índices proliferativos. A classificação de cada tumor baseou-se na de Nielsen (2004) para a mulher, já descrita, e os resultados permitiram a classificação em 4 grupos distintos de interesse. Em termos quantitativos os grupos Luminal A (RE+, HER-2-, Pcaderina e/ou p63 e/ou CK5 +/-) e Luminal B (RE+, HER-2+, Pcaderina e/ou p63 e/ou CK5 +/-) compreenderam, respetivamente 44,8% e 13,5% dos tumores; o subtipo Basal (RE-, HER-2-, Pcaderina e/ou p63 e/ou CK5 +) compreendeu 29,2%, e o subtipo HER-2

positivo, definido como o subtipo de tumores com sobre-expressão de HER-2, (ER-, HER-2+, Pcaderina e/ou p63 e/ou CK5 +/-) compreendeu 8.3%. Considerou-se um fenótipo Nulo ou Negativo para os tumores que não apresentaram imunoreatividade para qualquer marcador, correspondendo a 4,2% da totalidade dos tumores analisados.

Os tumores do subtipo Luminal A foram associados significativamente a carcinomas do tipo complexo, de grau histológico baixo, de baixo índice proliferativo e de comportamento pouco invasivo. Em termos imunohistoquímicos, estes tumores apresentaram-se simultaneamente negativos para os três marcadores basais (CK5, p63 e Pcaderina). Os tumores incluídos nos subtipos Basal e HER-2 positivo foram associados a carcinomas de células de tipo simples ou carcinosarcomas de elevado grau histológico (com os Basais a representar cerca de 55,6% dos tumores de grau III), com permeação vascular e elevados índices de proliferação. Os tumores do subtipo Basal, ao contrário do subtipo Luminal, expressaram muito frequentemente dois ou três dos marcadores basais simultaneamente, característica partilhada pelos do subtipo HER-2 positivo embora a um nível inferior.

As análises de sobrevivência permitiram também distinguir estes subtipos, com o Basal associado a um pior desfecho clínico que os Luminais (menor TS e TLD), havendo concordância em relação ao que está documentado para a mulher (Sorlie et al., 2001; van de Rijn et al., 2002; van't Veer et al, 2002; Sorlie et al., 2003). Já em relação ao subtipo molecular HER-2 positivo, apesar de este se relacionar com tumores de maior dimensão, maior grau de malignidade e índices de proliferação mais elevados, as cadelas apresentaram uma evolução clínica mais favorável que qualquer outro subtipo, contrariando os resultados obtidos para a mulher, de acordo com os quais o prognóstico para este tipo de tumor é semelhante ao do tipo Basal (Perou et al., 2000, Sorlie et al., 2001; Sorlie et al., 2003). A autora justifica este resultado com o número reduzido de tumores classificados neste subtipo.

Em 2010, surgiu um novo estudo, liderado por Sassi, com o objetivo de aplicar um painel imunohistoquímico com algumas variações ao de Gama (2008a) para efetuar a classificação molecular, verificar as suas correlações com o grau de invasão e o grau histológico e averiguar a sua contribuição prognóstica na prática clínica veterinária. Este painel consistiu em 5 marcadores moleculares: RE, RP, HER-2, CK14 e CK5/6. Os subtipos moleculares foram definidos como Luminal A (RE ou RP +, HER-2-), Luminal B (RE ou RP +, HER-2+), HER-2 positivo (RE ou RP -, HER-2+), Basal (RE, RP e HER-2-, CK5/6 ou CK14 +) e Não-classificado ou Normal (todos os marcadores negativos). De acordo com os critérios adotados para a organização em subtipos moleculares foram identificados três grupos: 49% dos tumores foram inseridos no subtipo Luminal B, 29% no Luminal A e 10,22% no Basal. Não se encontrou nenhum tumor que reunisse as condições para ser incluído no grupo HER-2-positivo, o que se

pensou justificar-se pela escassez de casos ou por uma situação epidemiológica. Neste estudo não se conseguiu estabelecer uma relação entre a classificação molecular e a invasão celular ou a classificação morfológica, mas foram encontradas relações significativas com o grau de malignidade: o subtipo Luminal A foi associado ao grau I e o Luminal B aos graus II e III. Quanto aos estudos de sobrevivência não houve diferenças significativas entre os diferentes subtipos moleculares, verificando-se, no entanto, melhores desfechos clínicos nos animais com tumores mamários do subtipo Basal que nos subtipos Luminais sendo que, destes, o Luminal B apresentou resultados ligeiramente piores que o Luminal A. A disparidade dos resultados em relação aos de Gama (2008a) foi justificada pelas diferenças ao nível da escolha de marcadores e dos critérios usados para a positividade dos mesmos.

Um outro grupo de investigadores (Im et al., 2014) considerou a tipificação de Sorlie (2001) e os próprios estudos anteriores (Kim, Lim, Im, Kim, & Sur, 2013) (que por sua vez haviam servido para confirmar o subtipo Basal como indicador de mau prognóstico e o diferenciar de Triplo-Negativos) para fazer uma caracterização molecular dos TMC, utilizando os marcadores RE, HER-2, CK14, p63, SMA- α e vimentina (sendo estes três últimos usados apenas nos tumores originários das células mioepiteliais para confirmar o seu tipo histológico). Deste estudo resultou a classificação dos 159 tumores analisados como 44,0% dos tumores inseridos no subtipo Luminal A, 22,6% no Luminal B, 5,6% no HER-2-positivo, 24,5% no Basal e 3,1% no Normal. A classificação histológica (pelos critérios de Goldschmidt et al., 2011) foi associada significativamente ao subtipo molecular, sendo os Luminais A associados aos carcinomas simples tubulares, aos carcinomas complexos e aos carcinomas em tumores benignos mistos e os Basais associados aos carcinomas sólidos. Também o grau histológico foi associado significativamente ao subtipo molecular, sendo os tumores do subtipo Luminal A frequentemente de grau I e II e os Basais comumente de grau III. Em 51% dos tumores do subtipo Basal havia invasão linfática e o subtipo Luminal A continha 47,6% de todos os casos em que a invasão linfática não se verificou. Estes resultados são coerentes com aqueles que têm sido publicados para os tumores mamários na mulher, com os subtipos moleculares Luminais a revelar uma menor agressividade e os Basais a definirem-se por características que são, em geral, consensuais quanto a um pior prognóstico. À data da escrita deste documento, as informações mais recentes quanto a um estudo referente à sub-tipificação molecular dos tumores mamários caninos *em grande escala* vêm do encontro realizado em Nantes pelo grupo ORPHEO (*Institut Regional du Cancer Nantes Atlantique* e ONIRIS – *Nantes Veterinary School*), patrocinado pelo *Institut National Du Cancer*, em Janeiro de 2014, no âmbito da investigação translacional de cancro da mama em modelos animais. A colaboração de diversas entidades com relevância na investigação oncológica pretendeu, no que aos tumores de mama

diz respeito, validar em cães e em gatos os marcadores imunohistoquímicos dos subtipos moleculares definidos por Nielsen et al. (2004), estabelecer uma correlação imunohistoquímica em termos de sub-tipificação e prognóstico, identificar vias de transdução de sinal (particularmente no que diz respeito aos tumores dos subtipos HER-2 positivo e Basal) e testar algumas terapias inovadoras, no sentido de haver uma translação para a patologia mamária humana. Relativamente à imunofenotipagem e prognóstico de carcinomas mamários caninos espontâneos, este estudo caracteriza-se pelo grande tamanho da amostra (350 casos), a restrição dos casos a carcinomas mamários invasivos, a utilização dos critérios usados pela Oncologia Humana e a análise por 4 patologistas veterinários e 1 patologista de Medicina humana. O painel de imunohistoquímica consistiu de p63 (para a exclusão de carcinomas *in situ*) e, para a imunofenotipagem em si, de RE, RP, HER-2, CK5/6, EGFR e Ki-67. Isoladamente, cada um dos marcadores teve a seguinte percentagem de tumores com marcação positiva: RE 16%, RP 11%, Ki-67 $36 \pm 17\%$, EGFR 53%, CK5/6 65% e HER-2 com marcação 0 ou 1+ em 92% e 2+ em 8%. Considerando a subtipificação de Nielsen (2004), 6% dos tumores foram incluídos no subtipo Luminal A, 17% no Luminal B, 59% nos Triplo-Negativo de tipo Basal, 18% nos Triplo-Negativo de tipo Não-Basal e não se contabilizou nenhum no subtipo HER-2 positivo (ausência de tumores com *score* 3+). Em termos de prognóstico houve, para um período mínimo de seguimento de dois anos, uma taxa de recidiva de 23%, uma taxa de metastização de 32% e 43% de mortes por progressão da doença. A taxa de sobrevivência a um ano foi de 49,1% e a 2 anos de 29,8%. Os TMC Triplo-Negativos, no geral, caracterizaram-se por um período de sobrevivência significativamente menor que os Luminal A. Por análise multivariada, os fatores de prognóstico independentes associados à sobrevivência específica foram o tamanho tumoral (<2 cm), a presença de permeação vascular e o fenótipo Luminal A.

Como conclusões, ao contrário do que havia acontecidos nos anteriores estudos relacionados tanto com os tumores mamários caninos como os humanos, a prevalência de tumores Luminais foi considerada rara (23% em caninos versus 70% humanos) e a de tumores do tipo Triplo-Negativo foi a predominante (77% em caninos, dos quais 59% basais, versus 20% humanos). Não será ainda fácil para qualquer patologista veterinário, nesta altura, fornecer um diagnóstico ou prognóstico baseado na classificação molecular já que, relativamente ao que se conseguiu para a mulher, começámos apenas ainda a dar os primeiros passos. Apesar de tudo o que aproxima os tumores das duas espécies, a adoção do sistema considerado para a mulher não pode ser feita levemente pela notabilidade das diferenças, havendo evidências fortes de especificidades de espécie em termos de carcinogénese e desenvolvimento. Temos, a título de exemplo, a proliferação celular mioepitelial ser frequente nos TMC mistos e complexos mas

incomum nos humanos (Sassi et al., 2010) e, à primeira apresentação clínica os tumores múltiplos (primários) serem frequentes nas cadelas mas não nas mulheres, entre outras.

II 9. Tratamento

II 9.1 Cirurgia

A cirurgia continua a ser o tratamento *gold-standard* para a maior parte dos tumores mamários caninos, excluindo os altamente metastizados e os carcinomas inflamatórios (Misdorp et al., 2002; Withrow & MacEwen, 2007; Cassali et al., 2014). A excisão cirúrgica permite o diagnóstico histopatológico e pode constituir a cura, por si só, em cães com carcinomas num estadio inicial da doença (estadio I), não invasivos e bem diferenciados, se as margens forem limpas e o cancro não se tiver disseminado (Fossum, 2007; Cassali et al., 2014). Isto acontece nos cães com tumores benignos e em aproximadamente 50% dos cães com TMC malignos. (Misdorp et al., 2002). Os restantes 50% dos cães terão já, provavelmente, micrometástases na altura da cirurgia, e eventualmente, beneficiariam de uma terapia adicional (Cassali et al., 2014). A abordagem cirúrgica depende do tamanho do tumor, da localização e do *status* do paciente animal. As diferentes técnicas cirúrgicas compreendem a lumpectomia, a mastectomia simples, a mastectomia regional, mastectomia unilateral e a mastectomia bilateral. (Fossum, 2007).

Se anteriormente havia estudos que sustentavam a não influência do tipo de cirurgia na taxa de recorrência ou tempo de sobrevivência, desde que assegurada uma ressecção com boas margens (Misdorp & Hart, 1979; MacEwen et al., 1985), veio posteriormente a mostrar-se que 58% dos cães que haviam sido sujeitos a uma mastectomia mais conservativa tiveram maior desenvolvimento de novos tumores no tecido ipsilateral remanescente (Stratmann et al., 2008), pelo que vários autores aconselham a que se efetuem modalidades mais radicais de cirurgia. Considerando-se o sistema linfático a principal via de metastização dos TMC é extremamente importante o conhecimento da drenagem linfática das mamas pelo cirurgião. Em mastectomias unilaterais e regionais com envolvimento das mamas inguinais, os linfonodos inguinais superficiais devem ser removidos por rotina (Misdorp et al., 2002; Patsikas et al., 2006; Sleenckx et al., 2011). Apesar de a ressecção dos linfonodos axilares ser igualmente recomendada quando as glândulas torácicas e abdominais craniais estão afetadas, esta é pouco realizada devido à dificuldade no acesso cirúrgico que a proximidade do plexo braquial representa (Misdorp et al., 2002). A extensão da excisão cirúrgica dependerá então do tamanho, localização e drenagem linfática das lesões (Cassali et al., 2014).

Apesar de abordagens cirúrgicas mais agressivas poderem assegurar maior segurança na prevenção do desenvolvimento neoplásico no futuro, existe sempre uma maior probabilidade de complicações pós-operatórias, com implicações a nível do conforto e qualidade de vida dos animais e sem a garantia de efetividade dessas medidas.

II 9.2 Tratamento sistémico

II 9.2.1 Na mulher

No que concerne ao tratamento sistémico, considerando o tema central desta monografia, consideramos importante a referência às guidelines de tratamento para a mulher (Goldhirsch et al., 2009; Goldhirsch et al., 2011, Curigliano et al., 2013; Goldhirsch et al., 2013; Untch et al., 2013). Na 12^a Conferência Internacional de St Gallen (Goldhirsch et al., 2011), com a finalidade de conseguir uma melhor adequação terapêutica, o Painel de Especialistas adotou uma nova abordagem à classificação das pacientes considerando a sub-tipificação biológica intrínseca, por uma aproximação derivada de critérios clinicopatológicos, ao invés de ensaios de expressão génica. Assim, no geral, as recomendações de terapia sistémica seguem esta sub-tipificação, já anteriormente apresentada, sendo que, para o subtipo Luminal A, a quimioterapia não deveria ser considerada como tratamento, dada a sua fraca responsividade, privilegiando-se a terapia endócrina isoladamente. Para o subtipo Luminal B, genericamente, a quimioterapia passa a ser considerada, sendo que a terapêutica com antraciclinas e taxanos deveria ser incluída no protocolo, adicionalmente à terapia endócrina. Relembrando o facto de haver aqui uma separação entre os Luminais B/ HER-2 negativos e luminais B/ HER-2 positivos, a estes últimos deveria ser adicionada uma terapêutica anti-HER-2. Em relação ao subtipo HER-2 positivo o Painel não chegou a um consenso quanto ao tipo de quimioterapia a usar, apesar de a maioria considerar igualmente proveitosa a inclusão de antraciclinas e taxanos. A opinião de utilização de trastuzumab foi unânime para todos os doentes pertencentes a esta categoria, devendo ser um tratamento efetuado simultaneamente à quimioterapia, ainda que nessa impossibilidade o seu uso sequencial fosse também aprovado. Finalmente, para o subtipo Triplo-negativo, o Painel mais uma vez considerou importante a inclusão dos agentes quimioterápicos supracitados aos quais adicionou um agente alquilante (ciclofosfamida), não apoiando o uso rotineiro de cisplatina ou carboplatina. Uma ligeira maioria considerou que a quimioterapia deveria ser mais agressiva do ponto de vista de dosagem enquanto uma larga maioria se opôs à inclusão de terapias antiangiogénicas antes que estejam disponíveis mais estudos sobre este tipo de tratamento.

A terapia neoadjuvante citotóxica foi considerada com uma importância que ultrapassa o seu papel facilitador na cirurgia conservativa, salientando-se o seu valor em termos de prognóstico, particularmente nos pacientes com tumores HER-2 positivo e Triplo-Negativo. A escolha do tipo de quimioterapia neoadjuvante deveria ser feita na mesma base da seleção dos tratamentos adjuvantes pós-operatórios. O painel não aconselhou o uso da terapia neoadjuvante citotóxica em pacientes com tumores de baixo índice proliferativo ou boa resposta à terapia endócrina.

II 9.2.2 Na cadela

Para a espécie canina, apesar de não haver ainda *guidelines* estabelecidas e de a maior parte dos benefícios deste tipo de tratamento estarem ainda em estudo, existem algumas evidências de que os cães que apresentam um estadio avançado da doença, com doença metastática ou com um tipo histológico agressivo, podem beneficiar de tratamento adjuvante como radioterapia, tratamento anti-Cox-2, quimioterapia, terapia hormonal com desmopressina ou antiangiogénica (Morris et al., 2001; Sorenmo et al., 2003; Hermo et al., 2008; Clemente et al., 2009). De qualquer forma, antes de se iniciar um tratamento, o dono deve ser corretamente informado sobre a pobreza de informações existentes relativas ao estabelecimento de um prognóstico rigoroso com base na adoção desse tipo de tratamento.

II 9.2.2.1 Terapias hormonais

Considerando as *guidelines* para o tratamento sistémico na mulher, este tipo de terapia seria o adequado para os subtipos Luminais na cadela.

O tamoxifeno, um inibidor seletivo não esteroide dos recetores de estrogénio com potente efeito antiestrogénico na mama, é atualmente o tratamento mais frequentemente utilizado em mulheres com tumores positivos a RE (Stuart-Harris & Davis, 2010). Exerce também uma função pró-apoptótica e antiangiogénica, independente da sua ligação com o recetor de estrógeno (Tavares et al., 2010). Teoricamente, seria uma boa opção para as cadelas com o mesmo subtipo de tumor. Os primeiros estudos (Morris et al., 2001), não conseguiram demonstrar qualquer atividade antitumoral por parte do tamoxifeno em cadelas. Adicionalmente, os animais submetidos a este tratamento mostraram efeitos secundários expressivos que incluíam piómetra, edema vulvar, corrimento vaginal, incontinência e sinais comportamentais de estro (Sleeckx et al., 2011; Cassali et al., 2014). Recentemente, perante a

deficiência de opções no que diz respeito a terapia sistêmica nas cadelas e a comprovação dos benefícios do tamoxifeno nas neoplasias mamárias humanas, Tavares et al. (2010) propuseram-se a avaliar de forma mais criteriosa os efeitos secundários decorrentes da sua utilização. As conclusões foram ao encontro das observadas na mulher, passando a considerar-se o tamoxifeno um tratamento adjuvante possível desde que com os efeitos secundários bem avaliados e controlados e recomendando-se o seu uso em animais esterilizados.

Ainda neste âmbito, para tratamento do cancro na mulher têm sido investigados os antagonistas de progesterona (PA) e os moduladores de recetores de progesterona (PRM) (Klijn, Setyono-Han & Foekens, 2000), tendo-se demonstrado que os PA apresentam uma atividade antitumoral superior ao tamoxifeno ou às progestinas em doses elevadas (Sleeckx et al., 2011). Além disso, a atividade antitumoral resultante de combinações de PA ou PRM com antiestrogénios provou-se superior à de um qualquer destes agentes sozinho (Nishino, Ishibashi, Hirtreiter & Nishino, 2009). Pensa-se que em cadelas os resultados possam ser semelhantes, não havendo ainda resultados clínicos que o comprovem.

A aglepristona, um bloqueador dos recetores de progesterona usado frequentemente em cadelas no tratamento de piómetra e na indução do parto ou aborto, parece ter um efeito antiproliferativo em carcinomas mamários caninos RP positivos (Guil-Luna et al., 2011), estando a comprovação do benefício da sua utilização como tratamento neoadjuvante dependente ainda de estudos.

A ovariectomia parece ser neste momento a solução mais prática como tratamento com influência a nível hormonal (Sorenmo et al., 2013). Alguns estudos demonstraram um aumento significativo na sobrevivência de cadelas com carcinomas mamários. Um estudo enfatizou a importância do momento da ovariectomia em relação ao da cirurgia mamária, sendo que apenas para cães que a realizassem num período de até 2 anos antes da cirurgia se verificaria o benefício desta (Sorenmo, Shofer & Goldschmidt, 2000). De acordo com um outro estudo, o benefício seria significativo apenas para cadelas com carcinomas complexos (Chang et al., 2005). De qualquer forma, é evidente a necessidade de estudos prospetivos em que o efeito da ovariectomia seja analisada no contexto do *status* hormonal dos tumores.

II 9.2.2.2 Quimioterapia

Neste momento já vários agentes quimioterápicos são utilizados em medicina veterinária apesar de existir ainda pouca informação disponível sobre doses, toxicidade e eficácia da quimioterapia, para que possa ser utilizada com frequência no tratamento paliativo ou adjuvante à cirurgia (Sorenmo et al., 2003). De acordo com as *guidelines* para a mulher, para os subtipos

Luminal B, HER-2 positivo e Triplo negativo, são recomendados os fármacos pertencentes às antraciclina e taxanos. Dentro destes, existem estudos em cadelas que apontam para aumentos significativos da sobrevivência com efeitos secundários ligeiros na combinação da mitoxantrona (análogo das antraciclina) e vincistina com a ciclofosfamida (Clemente et al., 2009) e para a combinação da ciclofosfamida com o 5-fluorouracil (Karayannopoulou, Kaldrymidou, Constantinidis & Dessiris, 2001). A salientar que a ciclofosfamida é particularmente recomendada para os Triplo-negativos.

A combinação da ciclofosfamida com a doxorrubicina (antraciclina), com ou sem 5-fluorouracil resultou em efeitos secundários de uma gravidade que acabou por limitar o estudo da sua eficácia (De M. Souza, Toledo-Piza, Amorim, Barboza & Tobias, 2009).

Em relação aos taxanos, nenhuma das opções apresentou viabilidade clínica. A utilização de paclitaxel resultou numa resposta parcial em 20% dos animais tratados mas os níveis de toxicidade verificados tornaram-se proibitivos da sua utilização (Poirier et al., 2004). Já a utilização de docetaxel, apesar da escassez de efeitos secundários, não resultou em diferenças significativas em termos de TLD ou TS (Simon et al., 2006). O mesmo se aplicou à doxorrubicina agindo isoladamente, também testada neste estudo (Simon et al. 2006) e à gemcitabina (Marconato et al., 2008). Para esta última, contudo, quando combinada com carboplatina, verificou-se uma taxa de resposta de 13%, com uma toxicidade hematológica e gastrointestinal ligeira a moderada (Dominguez, Devisis, Cadile, Sarbu & Kitchell, 2009). Em termos da utilização de quimioterapia como terapia adjuvante à cirurgia existe ainda um grande caminho a percorrer no sentido de encontrar protocolos com relevância clínica comprovada.

II 9.2.2.3 Terapia anti-HER-2

À exceção da terapia endócrina, nenhum outro tratamento sistémico de pacientes humanos com cancro da mama atingiu uma magnitude tão grande de benefícios como o trastuzumab (Herceptin®). Este anticorpo monoclonal humanizado está associado a melhorias significativas tanto no tempo livre de doença como na sobrevivência de mulheres com tumores HER-2 positivos, quando integrado num tratamento combinado ou sequencial com outros agentes quimioterápicos já referidos. No geral, pode-se dizer que a mortalidade seja diminuída para um terço, e o risco de recidiva diminuído em 40% (Pinto, Ades, Azambuja & Picart-Gebhart, 2013). Com o objetivo de facilitar estudos oncológicos no âmbito da oncologia comparada, Singer et al. (2012) compararam as homologias moleculares de HER-1 e HER-2, pretendendo investigar se os recetores caninos serviriam igualmente como alvos de tratamento pelos anticorpos

monoclonais humanizados (cetuximab e trastuzumab). Os resultados indicaram uma homologia aminoacídica das moléculas HER-2 humana e canina na ordem dos 92%. Mais, o epítipo canino, local de ligação ao trastuzumab, é igual ao humano com uma exceção para a alteração de um único aminoácido (Pro557 por Ser). A ligação do trastuzumab a células de carcinoma mamário canino foi confirmada por citometria de fluxo e, como resultado, verificou-se a inibição da proliferação do tumor. Estes dados apontam fortemente para a possibilidade de uma eficácia semelhante à que existe para humanos no tratamento de tumores de subtipo HER-2 em cadelas. Os custos comerciais deste tipo de tratamento tornam-no atualmente numa impossibilidade, pelo que não existem sequer estudos que permitam inferir do tipo de efeito em termos de sobrevivência e recidiva. Será importante nesta altura também referir que, mesmo em relação ao valor prognóstico da sobre-expressão de HER-2 nas cadelas e ao seu significado, existem ainda estudos com resultados e conclusões divergentes.

II 9.2.2.4 Outros tipos de tratamento

II 9.2.2.4.1 Desmopressina

A desmopressina é um derivado sintético da hormona antidiurética com propriedades hemostáticas que tem sido usado no tratamento da diabetes e da doença de von Willebrand em mulheres e cadelas. Nas cadelas com tumores mamários, Hermo et al. (2008, 2011) verificaram um aumento significativo nos tempos de sobrevivência e livre de doença depois da administração de desmopressina, de forma endovenosa, 30 minutos antes da cirurgia e 24 horas depois, sem a ocorrência de efeitos secundários. Sugeriu-se como explicação da ação antitumoral desta molécula a ação contrária desta substância às consequências de uma possível libertação para a circulação de células cancerígenas viáveis (Galan et al., 2002). A administração endovenosa de desmopressina induz uma libertação rápida de formas altamente mutiméricas do fator de von Willebrand (vW) das células endoteliais (Kaufmann & Vischer, 2003), que parecem ter um papel contra a disseminação de células tumorais em ratinhos (Terraube et al. 2006). Parece inibir a metastização através da redução da aderência das células malignas na microvasculatura. Adicionalmente, o fator de vW induz a apoptose de células *in vitro*. É possível ainda que haja outros mecanismos envolvidos no efeito antimetastático da desmopressina, como um efeito antiproliferativo, já demonstrado em linhas celulares (Ripoll et al., 2008). Apesar dos resultados promissores conseguidos até agora, são necessários ainda estudos que permitam confirmar a segurança e eficácia deste composto como tratamento adjuvante à cirurgia dos tumores mamários caninos (Sleeckx et al., 2011).

II 9.2.2.4.2 Inibidores da Cox-2

Os inibidores da Cox-2, como o piroxicam, são propostos como forma de tratamento dentro de estratégias preventivas em diversos tumores caninos (Millanta et al. 2006a; Queiroga et al. 2007; Lavalle et al. 2009; Queiroga et al., 2010) depois de se ter verificado que os níveis de Cox-2 são mais elevados em cães com tumores mamários malignos que benignos (Millanta et al. 2006a; Queiroga et al. 2007), assumindo-se esta como um alvo potencial. Estudos comparativos do TS e qualidade de vida obtidos por tratamentos quimioterápicos *versus* o uso de piroxicam em cadelas mostraram resultados significativamente melhores para este último (De M. Souza et al., 2009).

Sendo necessários mais estudos nesta área, os existentes mostram resultados também promissores para o uso deste tipo de substâncias.

II 9.3 Radioterapia

Existem já vários protocolos de radioterapia com resultados promissores instituídos para o tratamento paliativo de tumores caninos como o carcinoma nasal, o linfoma e o osteossarcoma (Hunley, Mauldin, Shiomitsu & Mauldin, 2010). Apesar de indicada para casos de tumores não completamente ressecionados, doença metastática ou carcinoma inflamatório (Morris et al. 1993; Sorenmo et al., 2003; Clemente et al., 2009) o seu benefício no tratamento adjuvante de tumores mamários caninos ainda não foi claramente demonstrado.

Capítulo III- Objetivos

São cada vez mais prolíficos os estudos sobre os TMC de uma perspectiva molecular, à semelhança do que vem acontecendo para a mulher, no sentido de se conseguir uma melhor caracterização destes, para o conhecimento mais profundo dos seus comportamentos biológicos. Uma das maiores dificuldades neste tipo de estudos continua a ser a grande disparidade de resultados obtidos em estudos anteriores, muito radicada na ausência de uniformização de metodologias e critérios de avaliação.

Os objetivos deste trabalho prendem-se com, através da utilização de métodos e critérios recentemente recomendados por Peña et al. (2014):

- 1- Relacionar as características imunofenotípicas dos tumores com as clinicopatológicas bem como as epidemiológicas das cadelas;
- 2 – Inferir ou validar o valor prognóstico de cada característica a partir de estudos associativos (utilizando-se para tal o valor prognóstico já conhecido de algumas das variáveis) e por estudos de sobrevivência: por análise do tempo de sobrevivência (TS) e do tempo livre de doença (TLD);
- 3- Verificar os níveis de significância da associação das características estudadas com os TS e TLD;
- 4- Verificar tendências de prognóstico por uma quantificação “temporal” mais concreta, pela análise objetiva dos tempos (TS e TLD) em meses;
- 5- Verificar quais as áreas nas quais as *guidelines* unificadoras permanecem insuficientes e em que pontos elas continuam a requerer elaboração, ou em que sentido devem ser estendidas;
- 6- Adquirir uma maior percepção das áreas em que os tumores de mama na cadela e na mulher podem ser considerados uma entidade comparável ou, pelo contrário, cada uma delas deve ser tratada de forma única, de acordo com a sua especificidade.

Capítulo IV – Material e Métodos

IV 1. Amostragem

IV 1.1 Recolha e processamento de amostras

O presente trabalho experimental teve como base o processamento e o estudo de amostras biológicas provenientes de massas tumorais mamárias de cadelas. Com o objetivo de, no período de tempo determinado pela duração do estágio, ser feita a recolha do maior número possível de massas tumorais, para além do Hospital Escolar Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa foram contactadas outras clínicas veterinárias: Clínica Veterinária Elsa Pereira, Clínica Veterinária de Sintra, Clínica Veterinária Vetemouras e Clínica do Anjo. No total foram obtidos tecidos de 41 animais. Dependendo das opções cirúrgicas individuais de cada instituição ou cirurgião, para alguns animais a cirurgia consistiu da excisão completa das massas tumorais identificadas e para outros correspondeu a uma excisão parcial (mastectomia unilateral com indicação de mastectomia contralateral em segundo tempo). À data do término da recolha, para nenhum dos animais se havia procedido à segunda cirurgia. A recolha das massas foi levada a cabo no período compreendido entre 22 de março de 2013 e 22 de novembro de 2013.

As cirurgias efetuadas no Hospital Escolar Veterinário foram acompanhadas pela aluna e a recolha das amostras a partir do momento da extirpação foi feita por esta, sendo que para as restantes clínicas se procurou igualmente fornecer as indicações e o material adequado, de forma a promover a standardização de todo o processo de recolha e processamento imediato das amostras. Não houve qualquer intervenção da aluna no sentido de condicionar o que seriam os procedimentos normais de cada clínica ou médico veterinário tendo sido todo o estudo baseado nos dados e nas amostras disponíveis.

Imediatamente após a extirpação, os tecidos resultantes foram colocados num recipiente próprio com formol tamponado a 10%, em proporção volumétrica adequada. Assegurou-se para todas as amostras um tempo de fixação entre as 24 e 48 horas, período após ou durante o qual foi feita a seleção macroscópica, por um Veterinário Patologista Veterinário (Professor Doutor Jorge Correia) e pela aluna, dos fragmentos das massas que seguiram para processamento e inclusão em parafina. O processo de inclusão foi efetuado pela equipa técnica do Serviço de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária de Universidade de Lisboa no processador de tecidos LEICA TP 1020® (Leica Microsystems, Nussloch, Alemanha), seguindo as normas da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) (Wolff et al., 2007). Para além de todas

as massas tumorais mamárias extirpadas (n=99), foram processados para análise os linfonodos retromamários ou inguinais superficiais, sempre que existentes no tecido proveniente da exérese.

IV 1.2. Seleção das amostras

Para a avaliação microscópica, diagnóstico histopatológico e seleção das amostras tumorais a utilizar, foram efetuados cortes com 3 µm de espessura, com o auxílio de um micrótomo (Leica RM 2135®, Nusslock, Alemanha), que foram posteriormente corados com hematoxilina-eosina (HE), montados entre lâmina e lamela e classificados histologicamente por um Veterinário Patologista Veterinário experiente (Prof. Dr. Jorge Correia).

A classificação histológica adotada foi a Misdorp et al. (1999) e o grau de malignidade foi atribuído de acordo com uma adaptação do sistema original de Elston e Ellis (1991), resumida na Tabela 2.

IV 1.3 Critérios de inclusão e exclusão no estudo

Para o estudo epidemiológico e clinicopatológico foram consideradas todas as 41 cadelas e tecidos delas provenientes. Sendo que 2 destas cadelas apresentavam patologia exclusivamente benigna (ectasias ductais e adenomas), para o estudo imunohistoquímico foram selecionadas amostras apenas das restantes 39 cadelas (com a apresentação de pelo menos um tumor com características de malignidade). Das 39 cadelas foram obtidas 97 massas tumorais. Uma vez que para muitas destas havia vários tumores com concordância de tipo histológico e grau de malignidade, foram selecionados, de cada cadela, apenas os tumores malignos representados uma única vez por esse tipo histológico e grau de malignidade. Foi excluído também um melanoma maligno por não se tratar de patologia de origem mamária, Apenas para verificação do tipo de marcação molecular conseguida, a título quase “ilustrativo”, incluíram-se: uma amostra de adenoma mamário, uma amostra de ectasias ductais e uma amostra de tecido mamário normal localizado em mama sem sinais de patologia mamária. De todos os linfonodos inguinais analisados, apenas dois, e correspondentes a animais diferentes, apresentaram evidência de metástase, pelo que apenas estes foram analisados imunohistoquimicamente. No total, a seleção consistiu então de 76 amostras a ser avaliadas em termos imunohistoquímicos, correspondendo a 69 carcinomas mamários, 1 sarcoma mamário (osteossarcoma), 1

carcinosarcoma, 2 linfonodos com evidência de metastização do processo neoplásico primário, 1 adenoma mamário, 1 amostra de tecido mamário com ectasias ductais e 1 amostra de tecido mamário normal.

Para o estudo do processo de metastização local, não tendo sido feita a recolha de quaisquer linfonodos em 4 das 39 cadelas com patologia maligna, a análise e conclusões encontram-se restritas a uma amostra de 35 cadelas. Os linfonodos recolhidos e analisados foram, para todas elas, os inguinais superficiais, considerando-se a ausência de metastização local sempre que este processo não se encontrava evidente nos linfonodos analisados, independentemente da localização das massas tumorais.

Todas as cadelas incluídas no estudo tiveram como tratamento único direcionado à patologia mamária, à data da colheita, a cirurgia. Para 5 destas cadelas o tratamento cirúrgico não foi curativo, não tendo sido retirada a totalidade do tecido mamário alterado.

IV 2. Estudo prospetivo e de seguimento

As informações obtidas em relação a cada um dos animais estudados foram as disponibilizadas pelos clínicos responsáveis pelo acompanhamento das cadelas. No que concerne ao Hospital Escolar Veterinário, os dados obtidos foram os disponíveis nas fichas clínicas dos animais, sendo tanto a elaboração da história clínica como o exame físico sempre realizados pelo clínico responsável, sem qualquer intervenção da aluna. Em relação às restantes clínicas/médicos veterinários, os dados foram obtidos da mesma forma. No entanto, foi entregue uma ficha a ser preenchida pelo clínico com os dados que se pretendiam analisar (Anexo A). As informações de relevância para o estudo incluíram: data de nascimento, raça, peso (por indisponibilidade de informação relativa à condição corporal), história de tratamentos preventivos de estro, *status* reprodutivo (esterilizada ou não e data de esterilização), antecedentes médico-cirúrgicos, história de patologia mamária, altura de deteção de massa mamária, radiografia torácica de despiste de metastização pulmonar, ecografia abdominal para despiste de metastização visceral, data da cirurgia, número de massas tumorais, localização das massas, tipo de cirurgia efetuada, extirpação total ou parcial das massas existentes à altura da cirurgia, ulceração, inflamação e aderência à pele ou outras estruturas dessas massas.

Posteriormente, após a análise macroscópica e microscópica, cada um dos tumores foi caracterizado de acordo com os seguintes parâmetros, quando aplicável: localização, dimensões (tamanho), classificação histopatológica, grau de malignidade, diferenciação mesenquimatosa óssea/cartilagínea, formações quísticas, necrose, infiltração celular linfoide, permeação

vascular e metastização ao nível dos linfonodos. Procedeu-se igualmente ao estadiamento TNM de cada um dos animais de acordo com as informações recolhidas. A metastização local foi considerada, para todos os tumores, de acordo com a sua evidência ao nível dos linfonodos inguinais superficiais, quando disponíveis para análise, e a metastização à distância de acordo com os resultados obtidos da análise imagiológica pulmonar. Naturalmente, exames adicionais efetuados, nomeadamente radiográficos ou ecográficos, foram igualmente considerados. Quando na inexistência de informações sobre os parâmetros requeridos o estadiamento não foi efetuado.

O seguimento dos casos foi feito por consulta das fichas clínicas disponíveis e, considerando o término do estudo o mês de março de 2015, procurou-se contactar por via telefónica os donos dos animais estudados, a fim de colmatar faltas de informação ou atualizá-las, nomeadamente sobre a sobrevivência ou a recidiva de doença mamária nas cadelas. O período de seguimento dos animais está compreendido entre os 16 e os 24 meses.

O tempo livre de doença (TLD) foi considerado o tempo, em meses, desde o tratamento cirúrgico até à evidência de recorrência ou metastização. O tempo de sobrevivência (TS) correspondeu ao tempo, em meses, da cirurgia até à morte relacionada com o cancro mamário, quer de causas naturais, quer por eutanásia.

IV 3. Imunohistoquímica (IHQ)

IV 3.1. Seleção de fragmentos para análise

Foi escolhida a técnica imunohistoquímica para a deteção e análise a nível molecular da expressão de 5 marcadores, RE, RP, CK5/6, HER-2 e Ki-67. Consistindo este trabalho na análise de um número apreciável de amostras, optou-se por se fazer uma seleção de fragmentos de cada corte obtido ao invés de utilizar toda a superfície de corte disponível. Assim, foram selecionadas frações com aproximadamente 6 mm de diâmetro, com as características teciduais desejáveis para este tipo de técnica (evitando-se áreas não tumorais, de necrose, quísticas e com diferenciação cartilagínea ou óssea). Nos blocos de parafina originais foram demarcadas as zonas selecionadas com o auxílio de um biótomo de 6 mm, feitos os cortes, destacados os fragmentos de tecido demarcados e colocados em lâminas adesivadas (SuperFrost™ Ultra Plus Adhesion Slides®, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham Massachusetts, EUA). Foram colocados 6 destes fragmentos em cada lâmina. No sentido de melhorar a aderência dos tecidos às lâminas estas foram colocadas em estufa a 64°C durante 1 hora e posteriormente a 37°C *overnight* (aproximadamente 16 horas).

IV 3.2 Descrição e especificidades da técnica imunohistoquímica

Sendo objetivo deste trabalho a detecção da expressão de vários marcadores, houve a necessidade da utilização de vários protocolos, com especificidades determinadas pelas características daqueles. A base dos protocolos foi gentilmente cedida pela Dra. Maria João Soares, doutoranda da FMV com experiência na detecção por IHQ dos mesmos marcadores tumorais mamários na espécie felina. Esta será apresentada em Anexo B, sendo neste capítulo apresentadas apenas as especificidades (Tabelas 3 e 4) para cada um dos marcadores, de uma forma esquematizada. O processo constante no Anexo B serviu para a marcação de RP, HER-2, CK5/6 e Ki-67 e os resultados revelaram-se satisfatórios à primeira realização do protocolo, não sendo necessária qualquer otimização. O mesmo não aconteceu com a tentativa de marcação de recetores de estrogénio, não se conseguindo qualquer marcação em tecidos tumorais mamários de cadela ou útero de cadela com os anticorpos disponíveis (clones 6F11 e SP1). O clone 6F11 havia, no entanto, permitido uma boa marcação em tecidos tumorais mamários felinos. A salientar a este propósito que, inclusivamente, a técnica imunohistoquímica foi realizada simultaneamente para tecidos de cadela e gata, com os mesmos reagentes e pelos mesmos operadores, havendo ausência de marcação para cadela e marcação satisfatória para gata. Na tentativa desta marcação, pela variação de passos e condições do protocolo inicial, procedeu-se à realização de um total de doze protocolos diferentes (Anexo C). Estas alterações basearam-se sempre nos protocolos descritos e publicados por investigadores que conseguiram marcação de RE nos seus trabalhos, apesar das variações a nível dos anticorpos anti-RE utilizados. Os nossos resultados foram sempre insatisfatórios pela ausência de marcação nas nossas amostras de tecidos de cadela, quer nos tecidos a estudar quer nos que se pretendia usar como controlos. Verificou-se também variabilidade de marcação nos controlos correspondentes a tecidos de gata e mulher comprovadamente positivos a RE. Da ausência de sucesso, na indisponibilidade financeira de adquirir novo anticorpo e na incapacidade de conseguir patrocínio para a sua compra, a aluna entrou em contacto com a autora correspondente (Prof.^a Dra. Renée L. Amorim) de um dos artigos cujo protocolo adotámos (Amorim et al., 2008), cujos resultados se baseavam na marcação de RE com o anticorpo disponível no nosso laboratório (clone 6F11), no sentido de confirmar o protocolo utilizado. Da discussão dos resultados (ou ausência destes) obtidos, face à dificuldade em encontrar uma explicação para a ausência de marcação, a Dra. Renée L. Amorim disponibilizou-se, muito generosamente, a receber os tecidos que se pretendia marcar e a realizar a técnica imunohistoquímica gratuitamente, por sua conta e responsabilidade, com o

anticorpo que utilizava então nos seus estudos (clone 1D5), na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp (São Paulo, Brasil).

Tabela 3: Especificidades dos protocolos para a detecção dos diferentes marcadores moleculares.

Marcador	Solução de recuperação Antígeno	Tampão de lavagem	Método de recuperação de antígeno	Bloqueio proteína	Controlo positivo
RP	Tampão citrato pH 6.0	PBS pH 7.3	Banho-maria	30 min	Tumor de mama mulher positivo PR
HER-2	Tampão citrato pH 6.0	PBS pH 7.3	Panela de pressão	8 min	SKBR3 em citobloco*
CK5/6	EDTA pH 9.0	PBS pH 7.3	Micro-ondas 900W 5 min+ 600W 15 min	8 min	Carcinoma de células escamosas de pele - gata
Ki-67	Tampão citrato pH 6.0	PBS pH 7.3	Panela de pressão	8 min	Amígdala de cão
RE	Tampão citrato pH 6.0	TRIS pH 7.4	Panela de pressão tipo pascal	30 min	Útero de cadela

Legenda: * - linha celular gentilmente cedida por Dra. Vukosava Torres, Instituto Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal. Protocolo para detecção de RE realizado por equipa de Prof.^a Dra. Renée L. Amorim

Tabela 4: Caracterização de anticorpos primários utilizados e particularidades de utilização.

Marcador	Anticorpo primário (Clone)	Tipo	Marca	Diluição	Tempo de incubação
RP	1E2	Monoclonal de coelho	Ventana®	RTU (<i>ready to use</i>)	<i>overnight</i> 4°C
HER-2	CB11	Monoclonal de ratinho	Invitrogen®	1:60	<i>overnight</i> 4°C
CK5/6	D5/16 B4	Monoclonal de ratinho	Thermo Scientific®	RTU (<i>ready to use</i>)	<i>overnight</i> 4°C
Ki-67	Anticorpo policlonal Ki-67	Policlonal de coelho	Thermo Scientific®	1:500	1h a temperatura ambiente
RE	1D5	Monoclonal de ratinho	Dako®	01:50	<i>overnight</i> 4°C

Legenda: Anticorpo primário para detecção de RE utilizado por equipa de Prof.^a Dra. Renée L. Amorim.

Foram enviados dois cortes de cada tecido, por correio, acondicionados em caixa de lâminas apropriada. Por motivos que nos são alheios, os cortes demoraram aproximadamente 25 dias a chegar ao Brasil e, depois de realizada a técnica imunohistoquímica, aproximadamente 32 dias a chegar a Portugal e ser desalfandegados. Descreve-se também em anexo (Anexo D), tal como facultadas, as linhas gerais do protocolo usado pela equipa da Prof.^a Dra. Renée Amorim na realização de IHQ.

IV 3.3 Avaliação imunohistoquímica

As lâminas foram analisadas e classificadas semiquantitativamente por dois veterinários patologistas sem cruzamento de resultados durante o processo, para além da aluna. Quando na presença de avaliações discordantes, os cortes foram analisados simultaneamente pelos dois veterinários através de um microscópio multiocular e o resultado foi discutido até se chegar a um consenso. As imunoreatividades foram avaliadas, sempre que possível, considerando o artigo de Revisão e Consenso de *guidelines* imunohistoquímicas para tumores mamários caninos por Peña et al. (2014).

IV 3.3.1 HER-2

Tabela 5: Critérios interpretativos para imunohistoquímica (IHQ) de HER-2 em tumores mamários caninos (adaptado de Peña et al., 2014).

Score IHQ	Critérios interpretativos
3+	Marcação forte, completa e homogénea da membrana em 30% ou mais das células tumorais
2+	Marcação fraca a moderada, completa e heterogénea da membrana em pelo menos 10% das células tumorais a forte e completa até 30% das células tumorais
1+	Marcação fraca e incompleta da membrana das células tumorais (qualquer percentagem)
0	Ausência de marcação da membrana das células tumorais

Os tumores foram avaliados quanto à marcação de HER-2 considerando a classificação adotada pela ASCO (Wolff et al., 2007), tal como recomendado pelo artigo de Peña et al. (2014), de acordo com a qual os tumores devem ser classificados em 0, 1+, 2+ e 3+ considerando a

intensidade, extensão e homogeneidade de marcação da membrana citoplasmática, segundo os critérios constantes na Tabela 5. A ASCO considera que deverão ser considerados positivos apenas os tumores com um *score* 3+.

IV 3.3.2 Citoqueratinas 5/6

A análise da marcação das citoqueratinas 5/6 foi feita semiquantitativamente considerando como positiva a marcação citoplasmática de células tumorais. Os resultados foram registados de acordo com a percentagem de células tumorais marcadas, tendo-se considerado um tumor CK5/6 positivo aquele que apresentasse uma percentagem de marcação superior a 10%. Sendo muito diversos os valores de *cut-off* de positividade na interpretação da marcação das citoqueratinas, tanto em estudos humanos como em cadelas, consideraram-se as recomendações de Peña et al. (2014) para os marcadores de diferenciação celular.

IV 3.3.3 Ki-67

Para a contagem de células marcadas positivamente e a determinação do índice de Ki-67 de cada tumor considerou-se a marcação nuclear destas, independentemente da sua intensidade. Para tal, foram tiradas fotografias com o microscópio ótico Olympus BX51 (Olympus, Pennsylvania, EUA) a vários campos, com a objetiva de 40x, em número nunca inferior a 5 (de forma a registar áreas de heterogeneidade do tumor em termos de marcação). As células marcadas e não marcadas foram contadas através do programa de análise de imagem: ImageJ (Open Source Software versão 1.46r, National National of Health, Bethesda, EUA) (Schneider, Rasband & Eliceri, 2012). Para a determinação deste índice procedeu-se, para cada amostra de tecido tumoral, a uma contagem total de 1000 células, sendo que na indisponibilidade destas se tentou assegurar uma contagem mínima de 500. De acordo com Cassali et al. (2014) os tumores podem ser classificados como de índice proliferativo alto (mais de 25% de núcleos marcados), de índice proliferativo intermédio (entre 10% e 25% de núcleos marcados) ou de índice proliferativo baixo (menos de 10% de núcleos marcados). Esta recomendação baseia-se num estudo de Peña (1998), no qual a classificação considerando estes valores de *cut-off* permitiu uma associação entre os elevados valores de Ki-67 e um elevado risco de metástase. Com finalidade de adequação estatística, os tumores são também dicotomizados em de índice proliferativo alto e baixo considerando apenas o valor singular *cut-off* de 25%. Gama et al.

(2008b), por sua vez, considerando como *cut-off* a mediana de todos os valores encontrados em lesões mamárias, optou pela dicotomização em índice proliferativo alto (superior ao valor de mediana) e índice proliferativo baixo (inferior ou igual ao valor de mediana). Este valor será obtido a partir dos resultados de contagens, pelo que figurará em capítulo respetivo. Aquele que é, ao conhecimento da autora à altura da redação, o último estudo em larga escala relacionado com a classificação de tumores mamários em cadelas (ORPHEO GROUP, 2014) assume um *cut-off* de 20% de núcleos marcados para essa separação. Para o estudo estatístico consideraram-se então os três sistemas de classificação dicotómica de Ki-67 no sentido de, não apenas os comparar, mas obter todo o espectro de associações estatísticas possíveis. Para uma maior facilidade de descrição, serão por vezes referidos os *cut-off* como de Peña, Gama ou ORPHEO em substituição aos valores que os definem.

IV 3.3.4 Recetores de estrogénio e progesterona

A imunoreatividade nuclear foi avaliada de acordo com o sistema semiquantitativo *Allred score* (Allred et al., 1998), segundo as recomendações de Peña (2014).

Neste sistema, o resultado final é um valor numérico entre 0 e 8 que resulta da soma de duas avaliações distintas: a percentagem de células positivas (marcação de núcleo) e a intensidade dessa marcação. Assim, para a percentagem de células positivas temos a atribuição dos seguintes valores: 1= marcação em <1% dos núcleos, 2 = marcação de 1% a 10% dos núcleos, 3 = marcação de 10% a 33% dos núcleos, 4 = marcação de 33% a 66% dos núcleos e 5 = marcação de 66% a 100% dos núcleos. A pontuação de acordo com a intensidade é obtida da seguinte forma: 0 = ausente, 1 = fraca, 2 = moderada, 3 = forte. O 0 corresponde à ausência de marcação.

Para os recetores de estrogénio não foi conseguida uma marcação considerada satisfatória nos tecidos destinados a funcionar como controlos positivos (útero/miométrio de cadela) ou nos tecidos de estudo, quer quando a imunohistoquímica foi realizada por nós, quer quando foi realizada pela equipa da Prof.^a Dra. Renée Amorim. Por esta razão não foi possível considerar a marcação de RE no nosso estudo.

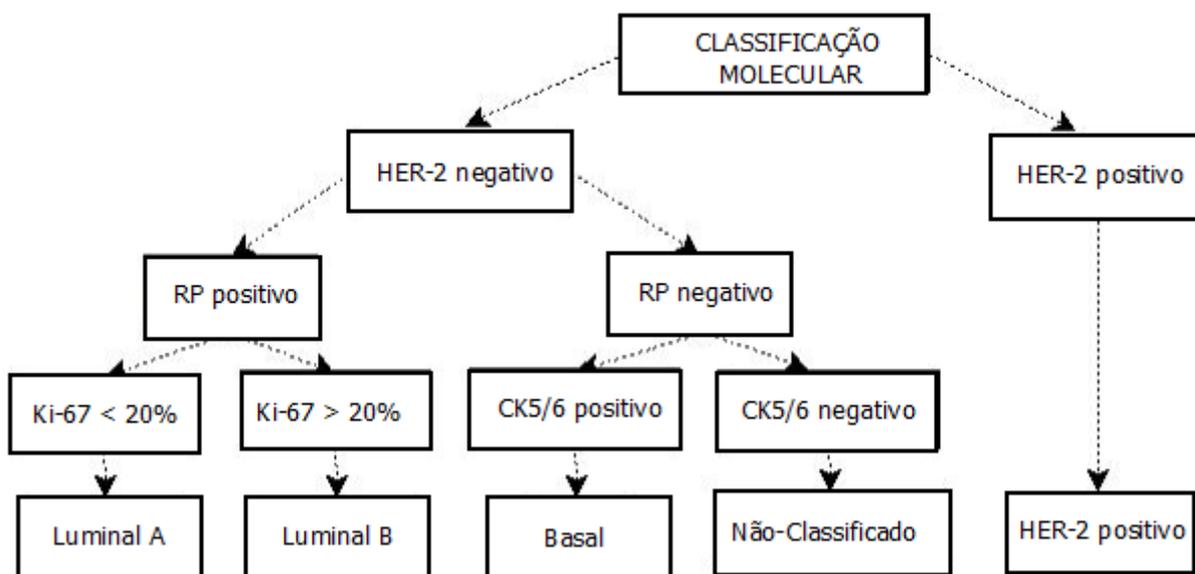
A intensidade da marcação considerada forte para os recetores de progesterona foi a conseguida no controlo. Peña (2014) considera que, para estudos analíticos, devem ser utilizados os valores numéricos de *score* atribuído (0 e 2-8) para definir classes independentes, pelo facto de não considerar haver ainda, para cadelas, um valor unânime de *cut-off* que permita uma separação clara entre tumores positivos e negativos para estes recetores. Em humanos assumiu-se um valor

de *score cut-off* de 3, considerando-se negativos os tumores com um *score* inferior a 3 e positivos de *score* igual ou superior a este (Hammond et al., 2010). Para a classificação molecular e para a análise estatística dos tumores foi considerada esta última classificação, para uma análise descritiva foram consideradas as duas formas de classificação.

IV 4. Classificação molecular

Ainda que na ausência de resultados quanto à marcação de recetores de estrogénio, consideraram-se os resultados obtidos com a marcação de recetores de progesterona suficientes para proceder a uma subtipificação dos tumores mamários. O painel consistiu nos marcadores RP, HER-2, CK5/6 e Ki-67.

Figura 1: Representação esquemática da classificação molecular usada neste trabalho (adaptada de ORPHEO, 2014).



A classificação molecular foi feita de acordo com uma adaptação dos critérios utilizados pelo grupo de investigadores que fizeram parte do grupo ORPHEO (2014) e que tiveram como base o estudo de Nielsen (2004). (Consideramos os subtipos moleculares Luminal A, Luminal B, Basal, HER-2 positivo e Não-Classificado.) Assim, os tumores foram primeiramente divididos em HER-2 negativos e HER-2 positivos. Os tumores HER-2 positivos (*score* 3) foram classificados no subtipo HER-2 positivo. Os tumores HER-2 negativos (*score* 0, 1 e 2) foram divididos em duas categorias de acordo com a marcação de RP: os tumores RP positivos foram divididos em Luminal A e Luminal B de acordo com a percentagem de marcação de Ki-67

(<20% de marcação e >20% de marcação de núcleos, respetivamente); os RP negativos foram classificados em Basais (se CK5/6 positivos) ou Não-Classificados (se CK5/6 negativos), como esquematizado na Figura 1.

IV 5. Análise estatística

Nos animais nos quais se verificou a existência de múltiplos tumores malignos foi feita a seleção do mais maligno (considerando os critérios histopatológicos e clínicos de Misdorp [2002]). Para a realização do estudo estatístico relacionado com as características epidemiológicas e clínicas e com a análise de TS e TLD, quando na existência de tumores de mesma classificação histopatológica e grau de malignidade, foram usados o tamanho e posteriormente o índice de Ki-67 como critérios para essa seleção. Nos estudos estatísticos que pretendiam caracterizar cada tumor como entidade individual foram consideradas todas as massas analisadas.

Para além das variáveis citadas no capítulo referente ao estudo prospetivo e de seguimento, foram analisadas as variáveis relativas à expressão dos vários marcadores moleculares detetada por imunohistoquímica, bem como as decorrentes da classificação molecular.

Toda a análise estatística foi realizada usando o programa IBM Statistics 20.

IV 5.1 Associação de variáveis por análise univariada

A análise univariada para a associação entre variáveis ordinais categóricas foi feita utilizando o teste de Qui² que, sempre que na presença de frequências esperadas inferiores a 5, foi substituído pelo teste exato de Fisher. Concluiu-se das diferenças entre grupos, quanto às características estudadas, quando a probabilidade de as diferenças encontradas nos dois grupos de amostra serem devidas ao acaso foi baixa. Particularmente, o valor de prova (p) <0.05 foi considerado estatisticamente significativo, mas foram consideradas tendências para associações com valores de prova superiores. Sempre que na presença de variáveis nominais ou contínuas, estabeleceu-se uma categorização dos dados. Dentro das variáveis cujos valores assumem uma resposta dicotómica relacionada com presença ou ausência de determinada característica (sim/não) temos: raça pura, cadela esterilizada (antes de aparecimento de tumor), OVH simultânea a mastectomia, tumores múltiplos, localização bilateral de tumores, extirpação completa de massas, metastização local (linfonodos), metastização à distância, diferenciação

mesenquimatosa, necrose e infiltração linfocitária. A permeação vascular linfática não foi utilizada como variável por não se ter verificado a sua existência em nenhum tumor analisado. O tamanho do tumor em análise foi dividido em classes de acordo com as recomendações da OMS (Owen, 1980), considerando-se T1 <3 cm; T2 = 3-5 cm; T3 > 5 cm. Foi adicionalmente dividido dicotomicamente, por conveniência estatística, considerando cada um dos valores limite, ou seja, em menores que 3 cm vs. iguais ou maiores que 3 cm e em menores ou iguais a 5 cm vs. maiores. O número de tumores foi agrupado considerando: 1 tumor, 2 tumores e mais de 2 tumores. A idade foi considerada como a idade da cadela à cirurgia pelo facto de, na maior parte dos casos, não haver indicação por parte dos donos de quando a massa tumoral teria sido detetada, sendo que a maior parte afirma que a deteção terá sido recente, independentemente do nível de desenvolvimento tumoral. Assim, as classes em que os animais foram agrupados foram, em anos, correspondentes aos intervalos: [6;8[; [8;10[; [10;12[; [12;14[; [14;16[e [16;18]. Considerou-se também a divisão de cadelas em novas (com menos de nove anos) e velhas (com nove anos ou mais), à semelhança do estudo de Gama et al. (2009). Para a análise do estadiamento TNM considerou-se cada um dos estadios como classe da variável, tal como para o grau de malignidade se considerou cada um dos graus atribuídos. Adicionalmente, foram feitas dicotomias usando como valor de separação cada um dos estadios e consideradas as dicotomias de tumores de grau I de malignidade ou superior e tumores de grau III de malignidade ou inferior. Quanto à classificação histopatológica, as categorias existentes corresponderam a carcinoma mamário de tipo complexo, carcinoma mamário de tipo simples, carcinoma mamário de tipo especial (de células escamosas), sarcoma (osteossarcoma) mamário, carcinosarcoma mamário e adenoma mamário.

As variáveis que consistem da expressão de marcadores moleculares foram categorizadas como consta no capítulo da avaliação imunohistoquímica. Assim, para HER-2 temos as classes negativo (*score* 0, 1 e 2) e positivo (*score* 3). As associações foram feitas quer considerando a divisão em classes de positivo/negativo, quer considerando a divisão por *score*. Também para RP foram consideradas as duas formas de caracterização dos tumores: em termos de *score* numéricos de *Allred* e em termos de classificação em positivo/negativo. Para as CK5/6 temos as classes negativo (percentagem de marcação até 10% das células) e positivo (percentagem de marcação superior a 10%). Finalmente, para o Ki-67 aplicámos 4 diferentes classificações, pela variação de valores de *cut-off* recomendados. Seguindo as recomendações de *cut-off* de Peña: consideramos um índice proliferativo alto (mais de 25% de núcleos marcados), um índice proliferativo intermédio (entre 10% e 25% de núcleos marcados) e um índice proliferativo baixo (menos de 10% de núcleos marcados). Consideramos também, como descrito anteriormente, a dicotomização dos tumores utilizando como *cut-off* único o valor de índice proliferativo

superior. Seguindo os trabalhos de Gama (2008b) temos apenas um índice proliferativo alto ou baixo, com o *cut-off* correspondente à mediana. Finalmente, por ORPHEO (2014) temos um índice proliferativo alto ou baixo com *cut-off* definido nos 20%. Para a classificação molecular consideraram-se apenas os tipos: Luminal A, Luminal B, HER-2 positivo e Basal, sendo excluídos os Não-Classificados. Sendo classificados os tumores epiteliais para os quais se conseguiu avaliar a expressão dos marcadores moleculares necessários, os sarcomas não foram considerados e, para os carcinossarcomas foi considerada a avaliação da parte carcinomatosa.

IV 5.2 Análise univariada por curvas de Kaplan-Meier

Para a avaliação do valor prognóstico das variáveis estudadas, quer a nível de TS quer a nível de TLD, foram geradas curvas de sobrevivência pelo método de Kaplan-Meier e foi utilizado o *Log-rank test* para a comparação estatística das diferentes curvas, tendo sido considerado estatisticamente significativo o valor de $p < 0.05$. Como critérios de exclusão para este estudo foram considerados o tratamento adjuvante pós-cirurgia (quimioterápico), a impossibilidade de seguimento cabal (quer por inexistência de dados constante nas fichas, quer por indisponibilidade de dados fornecidos pelos clínicos pelos donos) e, apenas para o estudo de TLD, a cirurgia não constituir um tratamento curativo (remanescendo massas tumorais mamárias).

Não foram utilizados para os estudos de TS e TLD os dados referentes às cadelas cujos tumores analisados correspondiam já, em si, à recidiva de tumor surgido anteriormente.

Capítulo V - Resultados

V 1. Dados descritivos

V 1.1 Variáveis clinicopatológicas

V 1.1.1 Estudo de casos

Neste estudo foram recolhidos dados referentes a 41 cadelas, com apresentação de neoplasias mamárias exclusivamente benignas ($n=2$; 4,88%) ou a apresentação de pelo menos uma neoplasia mamária maligna ($n=39$; 95,12%), de idades compreendidas entre os 6 e os 15 anos ($n=38$; média 11,03 \pm 2,455 anos; mediana 11,00 anos). Divididas as idades em classes de intervalos, a mais prevalente foi a dos 12 a 14 anos ($n=11$; 28,95%), seguindo-se as dos 10 a 12 anos ($n=10$; 26,32%), dos 8 aos 10 anos ($n=7$; 18,42%), dos 14 aos 16 ($n=6$; 15,79%) e, finalmente, a dos 6 aos 8 com a menor prevalência ($n=4$; 10,53%). Considerando a dicotomização de cadelas em nova/velha temos 11 (28,9%) com idade inferior a 9 anos e 27 (71,05%) com idade superior a 9 anos.

Das 38 cadelas em relação às quais havia informação disponível, no momento da cirurgia, 8 (21,05%) haviam sido submetidas a esterilização (ovariohisterectomia-OVH) anteriormente ao aparecimento da patologia mamária (embora depois dos dois anos e meio de idade) e 30 (78,95%) não haviam sido submetidas a qualquer processo de esterilização. Para 8 destas últimas (26,67%) a OVH foi realizada simultaneamente à mastectomia. As médias de idades de aparecimento de tumores mamários em cadelas ovariohisterectomizadas e não são, respetivamente, 11,32 \pm 2,144 anos e 10,88 \pm 3,182 anos.

Vinte e uma das cadelas foram identificadas como sendo de raça pura (51,22%) e 20 (48,78%) de raça indeterminada. As raças das cadelas que se apresentaram a consulta foram, por ordem decrescente de frequência: Caniche ($n=5$; 12,2%), *Yorkshire Terrier* ($n=3$; 4,9%), *Cocker Spaniel* ($n=2$; 4,9%), *Golden Retriever* ($n=2$; 4,9%), Pastor Alemão ($n=2$; 4,9%), Samoedo ($n=2$; 4,9%), Cão de Água ($n=1$; 2,4%), Labrador ($n=1$; 2,4%), Leão da Rodésia ($n=1$; 2,4%) Podengo ($n=1$; 2,4%) e *Shar-Pei* ($n=1$; 2,4%).

Foram observadas simultaneamente lesões mamárias benignas e malignas em 4 (10,26%) animais. As duas cadelas com neoplasia exclusivamente benigna apresentaram uma única lesão mamária identificável, correspondendo a um adenoma mamário numa e ectasias ductais na outra. Das 26 cadelas com neoplasias múltiplas (56,09%), 13 (50,00%) tiveram apresentação a nível de apenas uma cadeia mamária e 13 (50,00%) apresentação bilateral. Das cadelas com pelo menos uma neoplasia maligna ($n=39$), 13 (33,33%) apresentaram apenas um tumor e 26

(66,67%) apresentaram tumores múltiplos, sendo que 10 (25,64%) apresentaram 2 tumores e 16 (41,02%) apresentaram 3 ou mais tumores. A média de lesões tumorais por cadela foi de $2,41 \pm 1,659$ (mediana 2,00 tumores; intervalo entre 1 e 8 tumores).

Para 4 (10,26%) cadelas com lesão maligna, a cirurgia não foi curativa, remanescendo massas tumorais a ser retiradas em cirurgia posterior. Para as restantes 35 (89,74%), a cirurgia consistiu na extirpação completa das massas tumorais identificadas.

Considerando as informações disponíveis, verificou-se metastização regional em 2 (5,13%) de 35 cadelas para as quais foram recolhidos linfonodos e não se verificou metastização distante (pulmonar) em nenhuma das 32 cadelas submetidas a exame radiográfico torácico.

Cada neoplasia maligna de tipo epitelial foi classificada de acordo com o sistema TNM, tendo sido considerada, para o estadiamento clínico de cada animal, a de maior gravidade. Foi possível, de acordo com as informações disponíveis, realizar o estadiamento clínico para 29 animais, considerando-se então 18 animais (62,07%) no estadio I, 4 (13,79%) no estadio II, 5 (17,24%) no estadio III e 2 no IV (6,90%).

Para o estudo associativo de variáveis relacionadas com o animal foi necessário escolher um tumor representativo para cada cadela. As características dos tumores selecionados são aqui sumariamente descritas e apresentadas na Tabela 6.

O tamanho tumoral variou entre os 0,3 e os 18 cm ($n=41$; média $2,85 \pm 2,971$; mediana 2,00cm). De acordo com o sistema de classificação por tamanhos da OMS (Owen, 1980) verificou-se a existência de 28 tumores T1 (<3cm; 68,3%), 8 tumores T2 (3-5 cm; 19,5%) e 5 tumores T3 (>5 cm; 12,2%). Os tumores benignos pertenceram às categorias T1 e T2. Os tipos histológicos diagnosticados compreendem 1 osteossarcoma mamário (2,44%), 1 carcinossarcoma mamário (2,44%), 3 carcinomas mamários de células escamosas (7,32%), 15 carcinomas mamários simples (36,58%), 19 carcinomas mamários complexos (46,34%), 1 adenoma mamário (2,44%) e 1 lesão correspondente a ectasias ductais (2,44%). Foi atribuído um grau de malignidade a 38 destes tumores, havendo 11 (28,95%) com grau I de malignidade, 14 (36,84%) com grau II de malignidade e 13 (34,21%) com grau III de malignidade. Considerando apenas as cadelas com patologia maligna, verificou-se diferenciação mesenquimatosa em 15 (38,46%) dos tumores, infiltração celular linfocítica em 6 (15,38%) e necrose intratumoral em 16 (41,02%).

V 1.1.2 Estudo de tumores

Considerando todas as cadelas e um total de 99 lesões mamárias, os tipos histológicos diagnosticados encontram-se discriminados na Tabela 6. Dentro dos carcinomas mamários

complexos (n=57; 57,58%) foram diagnosticados 27 (27,27%) carcinomas tubulares e 30 (30,30%) carcinomas tubulopapilíferos. Os carcinomas mamários simples (n=24; 24,24%) dividiram-se em 13 (13,13%) carcinomas tubulares, 10 (10,10%) carcinomas tubulopapilíferos e 1 (1,11%) carcinoma anaplásico. Foram diagnosticados, dentro dos tipos especiais de carcinoma, 5 (5,56%) carcinomas de células escamosas. Ainda nos carcinomas malignos foram também diagnosticados 1 sarcoma (osteossarcoma) mamário (1,11%) e um carcinosarcoma mamário (1,11%). Considerando as lesões benignas, foram diagnosticados 4 adenomas mamários simples (4,44%) e 6 ectasias ductais (6,67%). Finalmente, um dos tumores foi diagnosticado como melanoma maligno (1,11%). Foi atribuído o grau de malignidade a 86 tumores malignos, inserindo-se 30 (34,88%) tumores no grau I de malignidade, 37 (43,02%) no grau II e 19 (22,10%) no grau III de malignidade.

Num total de 98 tumores para os quais existia informação sobre a sua localização, 17 (17,35%) mostraram sede nas glândulas torácicas (cranial e caudal, direita e esquerda), 2 (2,04%) apresentaram uma localização intermédia entre as glândulas torácicas e abdominais, 58 (59,18%) localizaram-se nas glândulas abdominais, 2 (2,04%) apresentaram uma localização intermédia entre as glândulas abdominais e inguinais e 19 (19,39%) localizaram-se nas glândulas inguinais. Considerando, à semelhança de Quaresma (2008), a divisão das glândulas em craniais (as torácicas), médias (abdominais craniais), caudais (abdominais caudais e inguinais) e múltiplas (a afetar mais que uma glândula), encontrámos: 17 (17,35%) tumores craniais, 19 (19,39%) médios, 54 (55,10%) caudais e 8 (8,16%) múltiplos.

Para as massas excisadas houve, em termos de diâmetro do eixo maior, uma amplitude de valores entre os 0,2 e os 18 cm (n=99; média $2,04 \pm 2,15$ cm; mediana 1,50 cm). De acordo com o sistema de classificação por tamanhos da OMS verificou-se a existência de 79 tumores T1 (<3cm; 79,80%), 15 tumores T2 (3-5 cm; 15,15%) e 5 tumores T3 (>5 cm; 5,05%).

Para os 86 carcinomas mamários verificou-se diferenciação mesenquimatosa cartilágnea em 26 (30,23%), óssea em 3 (3,49%) e simultaneamente óssea e cartilágnea em 9 (10,46%), perfazendo um total de 38 (44,17%) tumores com diferenciação mesenquimatosa e 48 (53,93%) carcinomas mamários malignos sem qualquer tipo de diferenciação. Dos 4 adenomas, 2 deles apresentaram diferenciação cartilágnea e 1 óssea.

Considerando a totalidade de neoplasias malignas (n=88), não se verificou permeação vascular em nenhuma das lesões, incluindo aquelas onde se verificou a existência de um processo de metastização regional, verificando-se a existência de necrose em 18 (20,45%) destas e de infiltração celular linfóide em 8 (9,09%).

Tabela 6: Variáveis clínicas e anatomopatológicas: distribuição por casos e tumores.

Variáveis Clínicas e Anatomopatológicas			
CASOS	<i>n/[n(%)]</i>	TUMORES	<i>n/[n(%)]</i>
TODAS AS CADELAS		TODOS OS TUMORES	
Idade (classes)	38	Tipo histológico	99
[6; 8[4 (10,53%)	Carcinoma complexo	57 (57,58%)
[8; 10[7 (18,42%)	Carcinoma simples	24 (24,24%)
[10; 12[10 (26,32%)	Carcinoma de células escamosas	5 (5,56%)
[12; 14[11 (28,95%)	Carcinossarcoma	1 (1,11%)
[14; 16[6 (15,79%)	Osteossarcoma	1 (1,11%)
Idade (nova/velha)	38	Adenoma	4 (4,44%)
<9	11 (28,95%)	Ectasias ductais	6 (6,66%)
>9	27 (71,05%)	Melanoma maligno	1 (1,11%)
Raça	41	Localização do tumor	98
Pura	21 (51,22%)	Craniais	17 (17,35%)
Indeterminada	20 (48,78%)	Medial	19 (19,39%)
Status reprodutivo	38	Caudais	54 (55,10%)
Inteira	30 (78,95%)	Múltipla	8 (8,16%)
Esterilizada antes de mastectomia	8 (21,05%)	Tamanho do tumor	99
Esterilizada aquando da mastectomia	8 (26,67%)	<3 cm	79 (79,80%)
Tipo histológico	41	3-5 cm	15 (15,15%)
Carcinoma simples	15 (36,58%)	>5 cm	5 (5,05%)
Carcinoma complexo	19 (46,34%)		
Carcinoma de células escamosas	3 (7,32%)	APENAS TUMORES MALIGNOS	
Carcinossarcoma	1 (2,44%)	Grau histológico	86
Sarcoma	1 (2,44%)	Grau I	30 (34,88%)
Adenoma	1 (2,44%)	Grau II	37 (43,02%)
Ectasias ductais	1 (2,44%)	Grau III	19 (22,10%)
Grau histológico	38	Necrose	88
Grau I	11 (28,94%)	Ausente	70 (79,54%)
Grau II	14 (36,84%)	Presente	18 (20,45%)
Grau III	13 (34,21%)	Diferenciação mesenquimatosa	86
CADELAS COM PATOLOGIA MALIGNA		(apenas carcinomas)	
Esterilizada aquando da mastectomia	5 (17,85%)	Ausente	48 (53,93%)
Extirpação total	39	Presente	38 (44,17%)
Não	4 (10,26%)		
Sim	35 (89,74%)		
Tamanho do tumor	39		
<3 cm	27 (69,23%)		
3-5 cm	7 (17,95%)		
>5 cm	5 (12,82%)		

Tabela 6 (continuação) - Variáveis clínicas e anatomopatológicas: distribuição por casos e tumores.

Variáveis Clínicas e Anatomopatológicas (cont.)			
CASOS	<i>n/[n(%)]</i>		TUMORES
			<i>n/[n(%)]</i>
Necrose	39		Infiltração linfocítica
Ausente	23 (58,97%)		Ausente
Presente	16 (41,02%)		Presente
Infiltração linfocítica	39		Permeação vascular
Ausente	33 (84,62)		Ausente
Presente	6 (15,38%)		Presente
Diferenciação mesenquimatosa	39		
Ausente	24 (61,54%)		
Presente	15 (38,46%)		
Metástase linfonodos	35		
Ausente	33 (94,28%)		
Presente	2 (5,71%)		
Metástase distante	32		
Ausente	32 (100,00%)		
Presente	0 (0,00%)		
TNM	29		
Estadio I	18 (62,07%)		
Estadio II	4 (13,79%)		
Estadio III	5 (17,24%)		
Estadio IV	2 (6,90%)		

V 2. Análise estatística

V 2.1 Análise univariada- Associação entre variáveis

V 2.1.1 Variáveis clínicas e clinicopatológicas

V 2.1.1.1 Estudo de casos

Como mencionado anteriormente, para cada um dos casos foi selecionado apenas um tumor que o representasse, considerando-se as características desse para a realização de associações entre variáveis.

A idade ao aparecimento dos tumores em cadelas não foi associada estatisticamente a nenhuma outra variável verificando-se, contudo, uma tendência para aparecer mais precocemente nas cadelas de raça pura que nas de raça indeterminada ($p=0.074$). Procurou-se uma associação entre a pureza da raça e o *status* reprodutivo e, com significado estatístico ($p=0.016$), verificou-se que as cadelas de raça pura foram significativamente mais submetidas a ovariectomia. Também nestas se verificou uma tendência ($p=0.074$) para os tumores serem de tamanho

inferior a 3 cm, havendo para as de raça indeterminada uma tendência para serem de tamanho superior.

A ocorrência de metastização em linfonodos foi estatisticamente associada ao estadio TNM IV ($p=0.002$), embora se tenha verificado já uma tendência para a ocorrência preferencial de metastização em cadelas em estadio TNM superior a II ($p=0.052$).

V 2.1.1.2 Estudo de tumores

Assumindo os 3 cm como valor base da dicotomização dos tumores em termos de dimensões, foram encontradas associações significativas com a necrose intratumoral ($p=0.004$, com maior ocorrência de necrose com o aumento do tamanho) e com a infiltração celular linfocítica ($p=0.037$, com maior ocorrência de infiltração com o aumento de tamanho). Passando a considerar o tamanho de 5 cm, as relações de dependência do tamanho com a necrose intratumoral e a infiltração celular mantêm-se, verificando-se a manutenção do significado estatístico em relação à necrose ($p=0.016$) mas perdendo-se em relação à infiltração linfocítica depois da correção de Fisher ($p=0.087$). Com a classificação histopatológica não se conseguiu chegar a associações com significado estatístico, apesar de se ter verificado a tendência para, com os tumores divididos em <3 cm ou ≥ 3 cm, os carcinomas simples serem tendencialmente menores que os complexos ($p=0.084$), tendência que se mantém mas esbate, quanto ao significado estatístico, quando considerados os tumores maiores ou menores/iguais a 5 cm ($p=0,228$). Para esta última divisão, a tendência é para os carcinomas simples e complexos apresentarem dimensões inferiores aos restantes tumores malignos ($p=0.073$).

Encontraram-se associações estatisticamente significativas entre a classificação histopatológica (considerando apenas os carcinomas epiteliais) e a infiltração celular linfocítica ($p=0.024$) com esta a ocorrer mais frequentemente em tumores de classificação histopatológica considerada de maior malignidade (de células escamosas) que menor (simples e complexos). Esta associação e tendência mantêm-se quando considerada a divisão dos carcinomas apenas em simples e complexos ($p=0.071$) com uma maior proporção de infiltração nos carcinomas de tipo simples e, quando considerada a separação dos carcinomas escamosos dos simples+complexos ($p=0.099$), a tendência de ocorrência de infiltração é maior para os carcinomas de tipo escamoso.

Para uma melhor avaliação da linearidade das associações com o grau histológico de malignidade, consideraram-se, adicionalmente, as duas divisões dicotômicas dos tumores: em de grau I ou superior e de grau III ou inferior. Considerando primeiramente os 3 graus de

malignidade, a separação dos tumores entre complexos/simples e restantes resultou numa associação estatisticamente significativa ($p=0.020$), com a tendência para o grau de malignidade III ser respeitante aos tipos histológicos considerados mais malignos (carcinossarcoma e carcinomas de células escamosas). Considerando a dicotomização dos tumores em de grau inferior e igual a III, além desta associação se manter, mantém-se também o significado estatístico ($p=0.041$), perdendo-se este, no entanto, quando o limiar de separação dos tumores de acordo com o grau passa a considerar o grau I como *cut-off*. Para as restantes associações entre o grau histológico de malignidade e o tipo histopatológico, os valores significativos a nível estatístico ou as tendências verificadas encontram sempre maior expressão quando a separação diz respeito ao limiar do grau III de malignidade. Considerando os carcinomas complexos, simples e de tipo escamoso, reencontramos a tendência supracitada ($p=0.070$), bem quando apenas os tumores complexos e simples são considerados ($p=0.065$). Entre o grau de malignidade e a necrose intratumoral encontrou-se uma associação estatisticamente significativa ($p=0.000$), com o aumento da presença de necrose intratumoral à medida que aumenta também o grau de malignidade. Considerando as dicotomias relativas ao grau de malignidade a associação mantém-se, bem como o significado estatístico ($p=0.000$ para a divisão considerando o grau III e $p=0.026$ para a divisão considerando o grau I).

A diferenciação mesenquimatosa foi associada significativamente a tumores de graus I e II de malignidade ($p=0.031$), a sua ausência aos de grau III.

Para a infiltração celular linfocítica, encontrou-se uma maior tendência de ocorrência nos tumores de grau III de malignidade ($p=0,070$).

Verificou-se uma tendência de associação entre o desenvolvimento de metástases regionais e a existência de tumores de graus II e III de malignidade ($p=0.085$).

V 2.1.2 Marcadores moleculares

As intensidades de imunomarcção para cada um dos marcadores analisados encontram-se resumidas na Tabela 7 e Tabela 8.

Para dois dos carcinomas não foi possível obter uma marcação satisfatória para a totalidade dos marcadores por manifesta ausência de qualidade dos tecidos submetidos à técnica imunohistoquímica (nomeadamente a existência de uma forte componente mesenquimatosa que condicionou a qualidade dos cortes efetuados).

V 2.1.2.1 Avaliação da expressão de Ki-67

Como havia sido referido no capítulo respeitante a “Material e Métodos”, foram utilizados vários valores *cut-off* para a diferenciação dos índices proliferativos em altos e baixos. Estando os *cut-off* de Peña e ORPHEO anteriormente descritos, resta clarificar que, de acordo com o método adotado por Gama, o valor de mediana calculado correspondeu a 16,4319% de células marcadas.

Considerando apenas os tumores representativos de cada caso e a caracterização de cada animal ao invés de cada tumor, foi possível chegar a algumas tendências e associações significativas. As cadelas de raça pura apresentaram, de acordo com o *cut-off* de Gama ($p=0.034$) e ORPHEO ($p=0.016$), tumores de índices proliferativos mais baixos que as cadelas de raça indeterminada. O índice proliferativo por Ki-67 e a idade ou o *status* reprodutivo à altura da mastectomia não evidenciaram qualquer tipo de relação estatística neste estudo. O estadió TNM IV foi associado, de forma quase significativa aos tumores de maior índice proliferativo, considerando o *cut-off* de 25% Peña ($p=0.052$), não tendo sido encontradas nenhuma outras associações dignas de registo com esta variável.

Considerando agora todos os tecidos analisados, a marcação de Ki-67 permitiu a avaliação dos seus índices proliferativos em 75 cortes. No tecido normal verificou-se uma contagem correspondente a 2,74% de células com núcleos marcados, nas ectasias ductais a contagem correspondeu a 3,01% de células e no adenoma mamário a percentagem de células com núcleos marcados foi de 18,99%. Os tumores malignos ($n=70$) apresentaram um índice proliferativo médio de Ki-67 de $21,00\pm 14,28\%$ (mediana 16,53%; intervalo 1,41% - 66,42%). O carcinossarcoma apresentou um índice de Ki-67 de 25,56% e o osteossarcoma de 48,70%. Considerando exclusivamente os carcinomas mamários ($n=68$), o índice médio foi de $20,53\pm 16,20\%$ (mediana 16,21%) havendo para os carcinomas complexos ($n=44$) um índice médio de $19,96\pm 12,40\%$ (mediana 16,53%), para os carcinomas simples ($n=19$) um índice médio de $22,05\pm 17,90\%$ (mediana 14,51%) e para os carcinomas de células escamosas ($n=5$) um índice médio de $19,79\pm 14,39\%$ (mediana 14,19%). Dentro dos carcinomas simples, o carcinoma anaplásico ($n=1$) apresentou um elevado índice de Ki-67 (58,74%).

Tabela 7: Distribuição do índice de Ki-67 por variáveis clinicopatológicas de acordo com diferentes *cut-off* considerados.

	Ki-67 Peña (adaptado Cassali et al., 2014)			Ki-67 Peña (1998)			Ki-67 Orntico (2014)			Ki-67 Gama et al (2008B)									
	<10%			≤25%			>25%			≤16,43%			>16,43%						
	(n)	(%)	(%)	(n)	(%)	(%)	(n)	(%)	(%)	(n)	(%)	(%)	(n)	(%)	(%)				
Classificação Histopatológica																			
Tecido mamário normal	1	100,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	100,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	100,0%	0	0,0%			
Ectasias ductais	1	100,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	100,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	100,0%	0	0,0%			
Adenomas mamários	1	0,0%	1	100,0%	0	0,0%	1	100,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	100,0%			
Carcinomas mamários	67	12	17,9%	38	56,7%	17	25,4%	50	74,6%	17	25,4%	24	35,8%	35	52,2%	32	47,8%		
CM complexos	44	7	15,9%	28	63,6%	9	20,5%	35	79,5%	9	20,5%	15	34,1%	22	50,0%	22	50,0%		
CM simples	18	4	22,2%	7	38,9%	7	38,9%	12	66,7%	7	38,9%	7	38,9%	10	55,6%	8	44,4%		
CM de tipo escamoso	5	1	20,0%	3	60,0%	1	20,0%	4	80,0%	1	20,0%	2	40,0%	3	60,0%	2	40,0%		
Carcinoma mamário	1	0	0,0%	0	0,0%	1	100,0%	0	0,0%	1	100,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	100,0%		
Carcinomas metastáticos	7	0	0,0%	1	14,3%	6	85,7%	1	14,3%	6	85,7%	1	14,3%	0	0,0%	7	100,0%		
Metástase	2	1	50,0%	0	0,0%	1	50,0%	1	50,0%	1	50,0%	1	50,0%	1	50,0%	1	50,0%		
Grau de malignidade																			
Grau I	21	3	14,3%	16	76,2%	2	9,5%	19	90,5%	2	9,5%	16	76,2%	5	23,8%	13	61,9%	8	38,1%
Grau II	31	5	16,1%	16	51,6%	10	32,3%	21	67,7%	10	32,3%	18	58,1%	13	41,9%	14	45,2%	17	54,8%
Grau III	16	4	25,0%	6	37,5%	6	37,5%	10	62,5%	6	37,5%	9	56,3%	7	43,8%	8	50,0%	8	50,0%
Diferenciação me senquimatosa																			
Não	39	8	20,5%	23	59,0%	8	20,5%	20	51,3%	19	48,7%	25	64,1%	14	35,9%	20	51,3%	19	48,7%
Sim	29	4	13,8%	16	55,2%	9	31,0%	20	69,0%	9	31,0%	19	65,5%	10	34,5%	15	51,7%	14	48,3%
Necrose																			
Não	56	10	17,9%	36	64,3%	11	19,6%	46	82,1%	10	17,9%	40	71,4%	16	28,6%	31	55,4%	25	44,6%
Sim	13	2	15,4%	3	23,1%	8	61,5%	8	61,5%	5	38,5%	4	30,8%	10	76,9%	4	30,8%	9	69,2%
Infiltração celular linfocítica																			
Não	61	10	16,4%	36	59,0%	15	24,6%	46	75,4%	15	24,6%	39	63,9%	22	36,1%	30	49,2%	31	50,8%
Sim	8	2	25,0%	3	37,5%	3	37,5%	5	62,5%	3	37,5%	5	62,5%	3	37,5%	5	62,5%	3	37,5%
Tamanho																			
<3	58	10	17,2%	36	62,1%	12	20,7%	46	79,3%	12	20,7%	39	67,2%	19	32,8%	33	56,9%	25	43,1%
3 - 5	9	3	33,3%	3	33,3%	3	33,3%	6	66,7%	3	33,3%	6	66,7%	3	33,3%	3	33,3%	6	66,7%
>5	3	0	0,0%	0	0,0%	3	100,0%	0	0,0%	3	100,0%	0	0,0%	3	100,0%	0	0,0%	3	100,0%
Metastização linfonodos																			
Não	56	12	21,4%	36	64,3%	8	14,3%	48	85,7%	8	14,3%	42	75,0%	14	25,0%	35	62,5%	21	37,5%
Sim	7	0	0,0%	1	14,3%	6	85,7%	1	14,3%	6	85,7%	1	14,3%	6	85,7%	0	0,0%	7	100,0%
Estadiamento TNM																			
I	42	9	21,4%	28	66,7%	5	11,9%	37	88,1%	5	11,9%	31	73,8%	11	26,2%	28	66,7%	14	33,3%
II	4	0	0,0%	2	50,0%	2	50,0%	2	50,0%	2	50,0%	2	50,0%	2	50,0%	0	0,0%	4	100,0%
III	4	2	50,0%	1	25,0%	1	25,0%	3	75,0%	1	25,0%	3	75,0%	1	25,0%	2	50,0%	2	50,0%
IV	7	0	0,0%	1	14,3%	6	85,7%	1	14,3%	6	85,7%	1	14,3%	6	85,7%	0	0,0%	7	100,0%
Classificação mole cular																			
Luminal A	27	5	18,5%	22	81,5%	0	0,0%	27	100,0%	0	0,0%	27	100,0%	0	0,0%	21	77,8%	6	22,2%
Luminal B	18	0	0,0%	5	27,8%	13	72,2%	5	27,8%	13	72,2%	0	0,0%	18	100,0%	0	0,0%	18	100,0%
HER-2+	13	6	46,2%	6	46,2%	1	7,7%	12	92,3%	1	7,7%	11	84,6%	2	15,4%	10	76,9%	3	23,1%
Basal	9	1	11,1%	5	55,6%	3	33,3%	6	66,7%	3	33,3%	7	77,8%	2	22,2%	4	44,4%	5	55,6%

Nota: apesar de considerados no texto para cada marcador, os tumores para os quais não se conseguiu marcação satisfatória para *todos* os marcadores não constam da tabela.

Não foi encontrada qualquer associação de dependência estatisticamente significativa entre o tipo histológico e o índice de Ki-67.

Os tumores de grau I de malignidade apresentaram uma média de índice de Ki-67 de $17,78 \pm 12,71\%$ (mediana 15,89%), os de grau II uma média de $17,15 \pm 8,62\%$ (mediana 15,72%) e os de grau III uma média de $20,00 \pm 16,63\%$ (mediana 14,41%). Um elevado índice proliferativo ($> 25\%$) foi associado estatisticamente ($p=0.028$) aos tumores de grau histológico de malignidade superior a I.

Considerando o tamanho tumoral tivemos para a categoria T1 uma média de $19,04 \pm 12,35\%$ (mediana 15,66%) de células marcadas, para a categoria T2 uma média de $25,95 \pm 17,23\%$ (mediana 17,23%) e para categoria T3 uma média de $30,92 \pm 10,12\%$ (mediana 25,85%). Verificou-se uma relação de interdependência entre o tamanho tumoral e o índice de Ki-67 para todas as categorizações, variando sempre no sentido direto (p sempre < 0.05 : divisão tricotômica de Peña com $p=0.029$; divisão dicotômica de Peña $p=0,014$; divisão de Gama $p=0.029$; divisão de ORPHEO $p=0.011$). Quando os tumores foram adicionalmente dicotomizados em tamanho superior/igual ou inferior a 3cm e tamanho superior ou inferior/igual a 5cm, o significado estatístico manteve-se para todas as categorizações exceto para a de ORPHEO e a divisão dos tumores em superiores/iguais e inferiores a 3 cm ($p=0.082$). Os valores de prova considerando os tumores divididos em maiores/iguais ou menores que 3 cm foram $p=0.039$ segundo os critérios de Peña, $p=0.015$ segundo os critérios de para Gama e 0.082 segundo os critérios de ORPHEO e, considerando os tumores divididos em maiores ou menores/iguais que 5 cm foram $p=0.015$ segundo Peña, $p=0.025$ segundo Gama e $p=0.005$ segundo ORPHEO. A média e a mediana de índices de Ki-67 foram semelhantes para tumores com e sem diferenciação mesenquimatosa ($20,88 \pm 13,56\%$; mediana 16,43% e $20,62 \pm 14,83\%$; mediana 16,64% respectivamente), assim como para os tumores com e sem infiltração celular linfocítica ($21,06 \pm 17,42\%$; mediana 15,25% e $20,68 \pm 17,89$; mediana 16,65% respectivamente). Não foram também encontradas associações significativas entre as variáveis. Já em relação à existência ou inexistência de necrose intratumoral, os valores compreendem alguma disparidade ($29,58 \pm 17,89\%$; mediana 27,62% e $18,86 \pm 12,41\%$; mediana 15,80%, respectivamente), o que se reflete na relação entre as variáveis, havendo significado estatístico nas relações entre elas, considerando todas as categorizações ($p=0.008$ para Peña e $p=0.004$ para ORPHEO) exceto a de Gama ($p=0.083$). Para todas, a necrose intratumoral verifica-se com maior frequência em tumores de maior índice proliferativo.

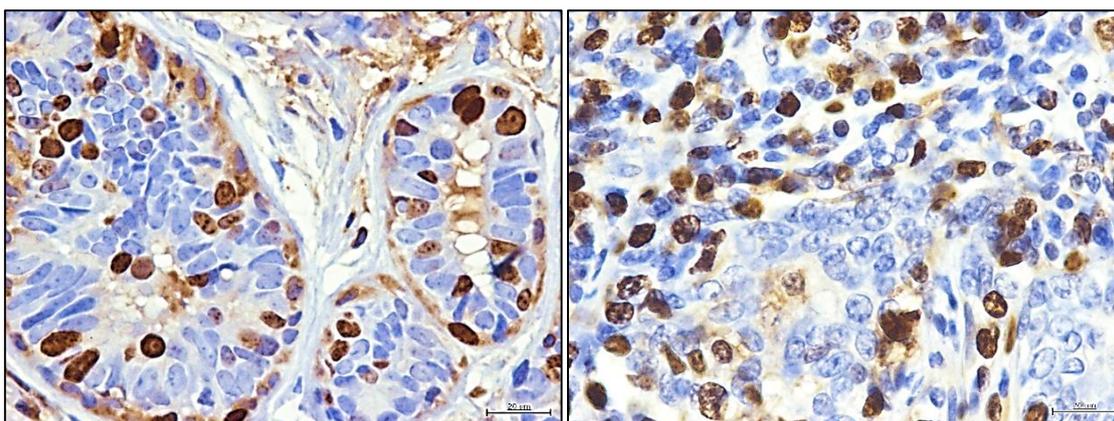
Para os 8 tumores correspondentes aos animais nos quais se verificou metastização local, a média de Ki-67 foi de $38,99 \pm 8,75\%$ (mediana 40,23%). Considerando todos os tumores foi encontrada sempre uma dependência estatisticamente significativa entre o índice proliferativo

de Ki-67 e a metastização regional ($p < 0.001$ segundo os critérios de Peña, $p=0.001$ segundo Gama e $p=0.002$ segundo ORPHEO). Para os casos em que foi detetado o envolvimento dos linfonodos em processo metastático, os tumores representativos de cada caso foram também estatisticamente associados de forma significativa aos maiores índices proliferativos de Ki-67 segundo Peña ($p=0.014$ para as 3 categorias e $p=0.035$ para o *cut-off* de 25%). Para os valores de ORPHEO e Gama a tendência de os tumores de animais a partir dos quais ocorreu metastização serem de maior índice proliferativo manteve-se, apesar de se tornar cada vez mais tênue com o decréscimo do valor *cut-off* considerado ($p=0.174$ e $p=0.486$ respetivamente). As duas metástases apresentaram índices proliferativos de 8,31% e 37,22%.

Quanto à relação com os restantes marcadores moleculares, não se encontrou qualquer relação com a expressão de RP ($p= 0.700$), embora pela análise dos dados se tenha verificado uma ligeira tendência de relação inversa de expressão para todos os *cut-off* considerados.

Os índices de Ki-67 foram estatisticamente associados de forma significativa com a classificação das CK5/6 quer considerando os valores segundo Peña ($p=0.014$) quer segundo ORPHEO ($p=0.040$), estando os tumores negativos às CK5/6 associados aos tumores de maiores índices proliferativos. Verificou-se, em geral, uma tendência para os maiores índices proliferativos corresponderem a tumores negativos a HER-2, embora o único significado estatístico encontrado ($p=0.029$) tenha sido para a divisão tricotómica segundo Peña ($p=0.098$ na dicotómica de Peña com correção de Fisher; $p=0.116$ segundo ORPHEO e $p=0.140$ segundo Gama).

Figura 2: Exemplos de marcação positiva para Ki-67 em tecidos tumorais mamários de cadela.



(Ampliação: barra corresponde a 20 μ m.)

Para a classificação molecular temos, para os tumores inseridos no subtipo Luminal A uma média de índice de Ki-67 de $13,05 \pm 49,40\%$ (mediana 13,85%), no subtipo Luminal B $34,64 \pm 12,17\%$ (mediana 29,68%), no subtipo HER-2 positivo $12,14 \pm 67,82\%$ (mediana

10,64%) e no subtipo Basal 23,98±20,22% (mediana 14,35%). O índice de Ki-67 foi associado estatisticamente à classificação molecular, sendo o subtipo Luminal B o que contribuiu mais fortemente para a significância da associação.

V 2.1.2.2 Avaliação da expressão de RP

O tecido mamário normal apresentou um *score* de 7, o adenoma mamário e as ectasias ductais um *score* de 5 e os carcinomas mamários ($n=67$) tiveram a seguinte distribuição: *score* 0: 4 carcinomas mamários (5,97%; 2 carcinomas simples e 2 carcinomas complexos); *score* 2: 6 carcinomas mamários (8,96%; 3 carcinomas de células escamosas, 2 carcinomas simples e 1 carcinoma complexo); *score* 3: 8 carcinomas mamários (11,94%; 7 carcinomas complexos e 1 carcinoma simples); *score* 4: 14 carcinomas mamários (20,90%; 1 carcinoma de células escamosas, 10 carcinomas complexos e 3 carcinomas simples, 1 dos quais anaplásico); *score* 5: 19 carcinomas mamários (28,36%; 1 carcinoma de células escamosas, 8 carcinomas simples e 10 carcinomas complexos); *score* 6: 7 carcinomas mamários (10,45%; 1 carcinoma simples e 6 carcinomas complexos); *score* 7: 7 carcinomas mamários (10,45%; 1 carcinoma simples e 6 carcinomas complexos); *score* 8: 2 carcinomas mamários (2,98%, os dois carcinomas complexos). Adotando o limiar de positividade utilizado para a classificação de tumores mamários na mulher, 14,92% dos carcinomas mamários foram negativos aos recetores de progesterona ($n=10$) e 85,07% positivos ($n=57$). Ao carcinossarcoma foi atribuído um *score* de 3. Não foi possível classificar o osteossarcoma.

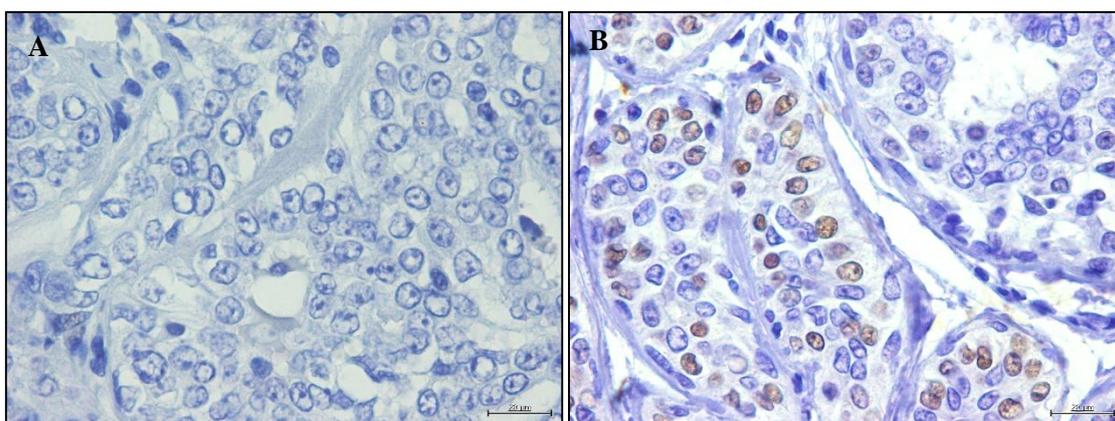
Considerando apenas os casos, 29 (78,38%) cadelas apresentaram tumores positivos a PR e 8 (21,62%) cadelas tumores negativos a PR. De acordo com a distribuição por *score Allred*, os tumores distribuíram-se da seguinte forma: 3 (8,11%) tumores de *score* 0, 5 (13,51%) tumores de *score* 2, 7 (18,92%) tumores de *score* 3, 9 (24,32%) tumores de *score* 4, 8 (21,62%) de *score* 5, 1 (2,70%) de *score* 6 e 4 (10,81%) de *score* 7. Foi feita uma média de *score* para comparação dos tipos histológicos e obtiveram-se os seguintes valores: 4,70 para carcinomas complexos; 4,29 para carcinomas simples; 4,00 para o carcinoma anaplásico e 3,00 para carcinomas de células escamosas e o carcinossarcoma. As duas metástases nos linfonodos apresentaram *scores* de 0 e 3. Dos 7 tumores malignos primários pertencentes aos animais nos quais se verificou envolvimento dos linfonodos, apenas um foi classificado como negativo para RP, contabilizando-se três dos tumores no limiar de positividade (*score* 3), 2 tumores com *score* 4 e um com *score* 5.

Em termos epidemiológicos, a classificação dos tumores quanto aos recetores de progesterona foi associada, de uma forma significativa ($p=0.037$), com o *status* reprodutivo (havendo maior expressão nas cadelas não submetidas a qualquer procedimento de esterilização) e com a pureza da raça, verificando-se uma expressão mais significativa deste marcador ($p=0.048$) nas de raça indeterminada. Em relação à idade não se verificaram associações com significado estatístico. Os carcinomas mamários de células escamosas foram, por oposição ao grupo de tumores formados pelos carcinomas simples e complexos, associados de forma estatisticamente significativa à ausência de imunoreatividade a RP ($p=0,021$). Da separação destes últimos resulta uma tendência para uma maior expressão nos carcinomas complexos, embora aqui não significativa ($p=0.179$).

Os tumores com imunomarcção negativa foram associados também ao grau III de malignidade ($p=0.038$), correspondendo este grau a metade destes carcinomas.

Com as restantes variáveis analisadas não se encontraram associações significativas nem se verificaram tendências dignas de serem mencionadas.

Figura 3: Exemplos de marcação ou ausência para RP em tecidos tumorais mamários de cadela.



Legenda: A- Tecido sem marcação para RP; B- Tecido com marcação para RP.
Ampliação: barra corresponde a 20 μ m

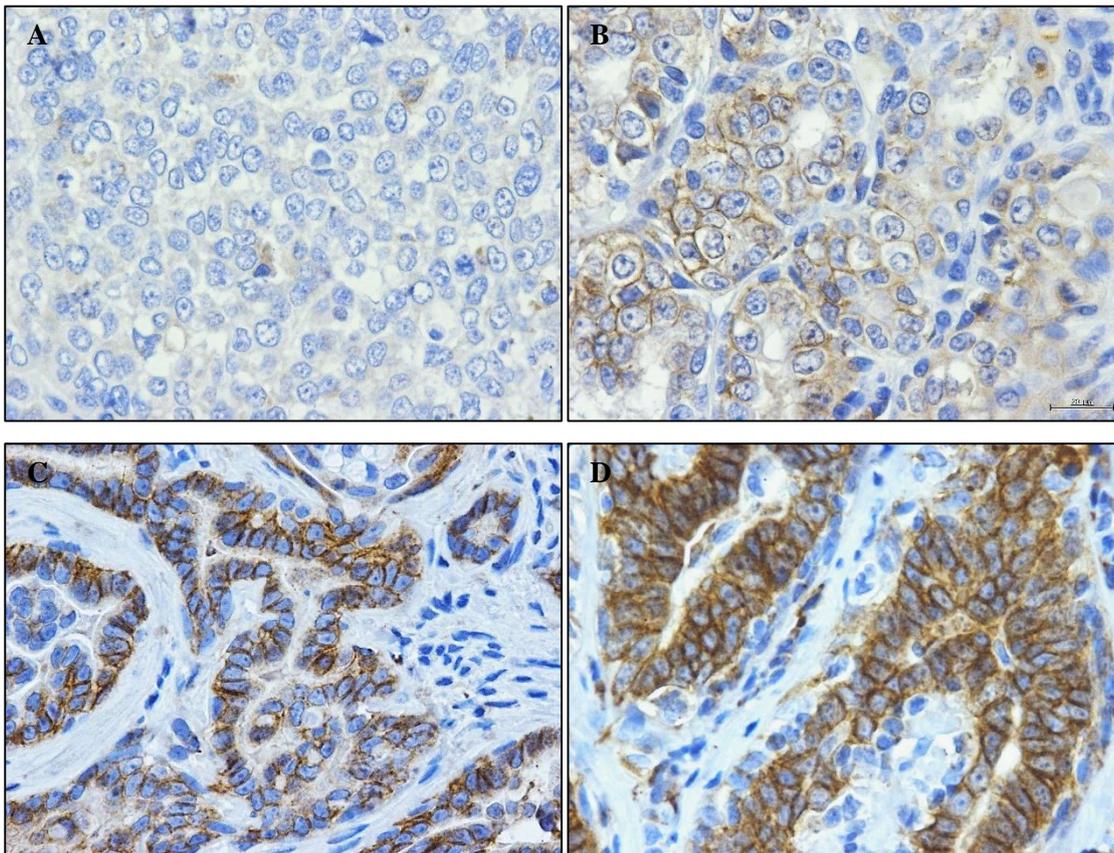
V 2.1.2.3 Avaliação da expressão de HER-2

A avaliação da expressão de HER-2 foi possível em 73 amostras. O tecido mamário normal apresentou um *score* de 1+, as ectasias ductais um *score* 2+, o adenoma mamário um *score* 3+ e o carcinosarcoma um *score* de 1+. A marcação de HER-2 na nossa amostra de carcinomas mamários malignos ($n=67$) resultou numa percentagem de 19,40 % de tumores HER-2 positivos (*score* 3+: $n=13$), havendo nos tumores HER-2 negativos uma percentagem de tumores com

um *score*=0 de 8,96% ($n=6$), com um *score*=1+ de 52,23% ($n=35$) e com um *score*=2+ ($n=13$) de 19,40%.

Considerando os casos individualmente, 7 (18,92%) cadelas apresentaram tumores HER-2 positivos (*score* 3+), 5 (13,51%) apresentaram tumores com *score* 0, 19 (51,35%) apresentaram tumores com *score* 1+ e 6 (16,22%) apresentaram tumores com *score* 2+.

Figura 4: Exemplos de marcação para HER-2 em tecidos tumorais mamários de cadela.



Legenda: A- *score* 0; B- *score* 1+; C- *score* 2+; D- *score* 3+. Todas as imagens têm a mesma ampliação: barra corresponde a 20 μ m.

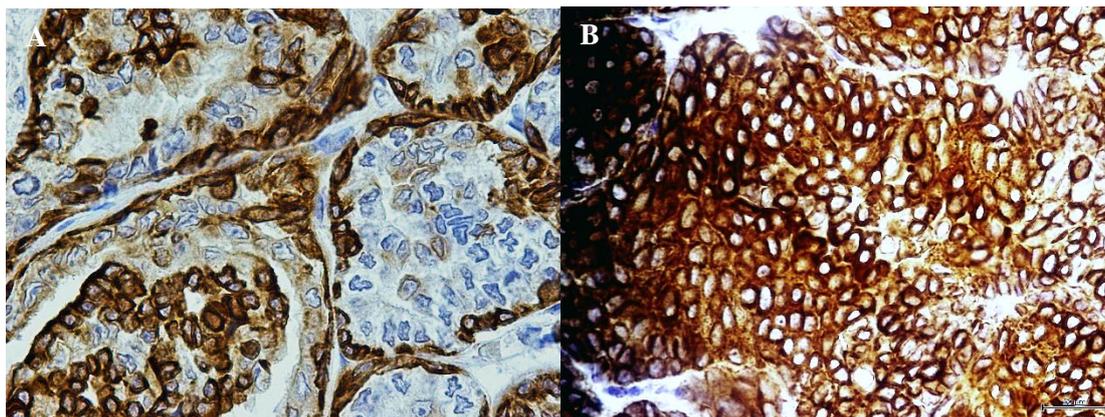
Foram analisados 7 tumores dos 2 animais nos quais se verificou a ocorrência de metastização regional. Para todos eles, a classificação correspondeu a um *score* 1+, considerando-se negativos para HER-2. Já às respectivas metástases em linfonodos corresponderam *scores* 2+ e 0. Dos tumores positivos a HER-2 ($n=13$), 61,54% corresponderam a carcinomas complexos (18,18% do total destes) e 38,46% corresponderam a carcinomas simples (25,00% do total destes), concluindo-se então da maior frequência nos carcinomas simples. Nos tumores de grau III de malignidade, 25,00% sobre-expressaram HER-2; nos de grau II de malignidade, 19,35% e nos de grau I de malignidade, 14,28%. A grande maioria dos tumores positivos para HER-2 não apresentou necrose (92,30%) ou infiltração celular linfocítica (84,62%). O tamanho médio destes tumores foi de $2,08 \pm 1,48$ cm (mediana 2,00; intervalo entre 0,5 e 6cm).

Para nenhuma das variáveis analisadas acima se encontrou uma relação de dependência com significado estatístico. Verificou-se, no entanto, uma tendência de associação da sobre-expressão do HER-2 com índices proliferativos de Ki-67 menores, considerando qualquer um dos *cut-off* (p=0.098 segundo Peña, p=0.140 segundo Gama e p=0.116 segundo ORPHEO).

V 2.1.2.4 Avaliação da expressão de CK5/6

Tanto no tecido mamário normal como no adenoma e nas ectasias ductais verificou-se imunoreatividade para as CK 5/6 nas células basais ou orientadas basalmente nas zonas adenomatosas. Dos 67 carcinomas mamários analisados, 65 (97,01%) foram considerados positivos para este marcador, tal como apresentado na Tabela 8. No osteossarcoma e no carcinosarcoma não se verificou imunoreatividade. Os cinco carcinomas mamários escamosos apresentaram uma marcação muito intensa, com uma média de 85,00% de células marcadas. Considerando apenas os tumores representativos encontramos 3 (8,11%) cadelas com tumores negativos para CK5/6 e 34 (91,89%) com tumores positivos. Todos os 7 tumores correspondentes aos 2 animais nos quais se verificou metastização apresentaram positividade à imunomarcagem enquanto uma das metástases se apresentou positiva a CK5/6 e a outra negativa. Tendo em linha de consideração o facto de a grande maioria dos tumores serem positivos para as CK5/6, optamos aqui por analisar mais detalhadamente os carcinomas nos quais se verificou a ausência dessa marcação. Os 2 carcinomas mamários sem marcação apresentaram 2,5 cm de tamanho, ambos carcinomas simples, com grau I de malignidade, sem diferenciação mesenquimatosa. Apenas um deles apresentava necrose intratumoral. Com estes resultados foi encontrada uma tendência para os tumores não imunorreativos às CK5/6 não apresentarem necrose intratumoral, embora não se possa falar de uma associação estatisticamente significativa (p=0.089). O mesmo se aplica à classificação histopatológica dos tumores em simples e complexos, sendo os complexos associados à imunoreatividade ao CK5/6 e os simples associados à não reatividade (p=0.081). Na avaliação dos índices proliferativos os tumores imunorreativos a CK5/6 apresentaram um índice de Ki-67 inferior aos não reativos (Peña: p=0.014; ORPHEO p=0.040).

Figura 5: Exemplos de marcação positiva para CK5/6 em tecidos tumorais mamários de cadela.



Legenda: Marcação menos (A) e mais (B) abundante para CK5/6 em carcinomas mamários. As duas imagens correspondem a tumores com marcação positiva para CK5/6. Figura A com marcação mais diferenciada de células mioepiteliais.
Ampliação: barra corresponde a 20µm.

Tabela 8: Distribuição de imunomarcção para RP, HER-2 e CK5/6 por variáveis clinicopatológicas

	(n)	RP				HER-2				CK 5/6			
		negativo (n)	positivo (%)										
Classificação Histopatológica													
Tecido mamário normal	1	0	0,0%	1	100,0%	1	100,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	100,0%
Ectasias ductais	1	0	0,0%	1	100,0%	1	100,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	100,0%
Adenomas mamários	1	0	0,0%	1	100,0%	0	0,0%	1	100,0%	0	0,0%	1	100,0%
Carcinomas mamários	67	10	14,9%	57	85,1%	54	80,6%	13	19,4%	2	3,0%	65	97,0%
CM complexos	44	3	6,8%	41	93,2%	36	81,8%	8	18,2%	0	0,0%	44	100,0%
CM simples	18	4	22,2%	14	77,8%	13	72,2%	5	27,8%	2	11,1%	16	88,9%
CM de tipo escamoso	5	3	60,0%	2	40,0%	5	100,0%	0	0,0%	0	0,0%	5	100,0%
Carcinosarcoma mamário	1	0	0,0%	1	100,0%	1	100,0%	0	0,0%	1	100,0%	0	0,0%
Carcinomas metastáticos	7	1	14,3%	6	85,7%	7	100,0%	0	0,0%	0	0,0%	7	100,0%
Metástase	2	2	100,0%	0	0,0%	2	100,0%	0	0,0%	1	50,0%	1	50,0%
Grau de malignidade													
Grau I	21	3	14,3%	18	85,7%	18	85,7%	3	14,3%	0	0,0%	21	100,0%
Grau II	31	2	6,5%	29	93,5%	25	80,6%	6	19,4%	1	3,2%	30	96,8%
Grau III	16	5	31,3%	11	68,8%	12	75,0%	4	25,0%	2	12,5%	14	87,5%
Diferenciação mesenquimatosa													
Não	39	7	17,9%	32	82,1%	31	79,5%	8	20,5%	2	5,1%	37	94,9%
Sim	29	3	10,3%	26	89,7%	23	79,3%	6	20,7%	1	3,4%	28	96,6%
Necrose													
Não	56	7	12,5%	49	87,5%	43	76,8%	13	23,2%	1	1,8%	55	98,2%
Sim	13	3	23,1%	10	76,9%	12	92,3%	1	7,7%	2	15,4%	11	84,6%
Infiltração celular linfocítica													
Não	61	9	14,8%	52	85,2%	49	80,3%	12	19,7%	3	4,9%	59	96,7%
Sim	8	1	12,5%	7	87,5%	2	25,0%	6	75,0%	0	0,0%	8	100,0%
Tamanho													
<3	58	9	15,5%	49	84,5%	46	79,3%	12	20,7%	2	3,4%	56	96,6%
3 - 5	9	1	11,1%	8	88,9%	1	11,1%	8	88,9%	0	0,0%	9	100,0%
>5	3	0	0,0%	3	100,0%	2	66,7%	1	33,3%	1	33,3%	2	66,7%
Metastização linfonodos													
Não	56	8	14,3%	48	85,7%	42	75,0%	14	25,0%	2	3,6%	54	96,4%
Sim	7	1	14,3%	6	85,7%	7	100,0%	0	0,0%	0	0,0%	7	100,0%
Estadiamento TNM													
I	42	7	16,7%	35	83,3%	32	76,2%	10	23,8%	2	4,8%	40	95,2%
II	4	0	0,0%	4	100,0%	3	75,0%	1	25,0%	0	0,0%	4	100,0%
III	4	3	75,0%	1	25,0%	3	75,0%	1	25,0%	0	0,0%	4	100,0%
IV	7	1	14,3%	6	85,7%	7	100,0%	0	0,0%	0	0,0%	7	100,0%
Classificação molecular													
Luminal A	27	0	0,0%	27	100,0%	27	100,0%	0	0,0%	0	0,0%	27	100,0%
Luminal B	18	0	0,0%	18	100,0%	18	100,0%	0	0,0%	1	5,6%	17	94,4%
HER-2+	13	1	7,7%	12	92,3%	0	0,0%	13	100,0%	0	0,0%	13	100,0%
Basal	9	9	100,0%	0	0,0%	9	100,0%	0	0,0%	0	0,0%	9	100,0%

V 2.1.3 Classificação molecular

V 2.1.3.1 Estudo de casos

Para as 39 cadelas com patologia mamária maligna foi selecionado um tumor representativo, de acordo com os critérios indicados no “Material e Métodos”.

Para duas cadelas os tumores selecionados corresponderam a lesões mamárias malignas (osteossarcoma e carcinoma mamário simples) para as quais não foi possível obter marcação imunohistoquímica com qualidade suficiente para realizar uma classificação indubitável. De acordo com essa seleção temos obtivemos, de 37 animais, 11 (29,73%) classificados no subtipo Luminal A, 12 (32,43%) no subtipo Luminal B, 7 (18,92%) no subtipo HER-2 positivo, 6 (16,22%) no subtipo Basal e 1 (2,70%) entrou na categoria “Não-Classificado”. A pureza da raça foi associada à ocorrência de tumores dos subtipos HER-2 positivo e Basal ($p=0.029$) por oposição aos de subtipo Luminal A e B. Esta dependência assume ainda mais significado estatístico ($p=0.018$) opondo apenas o Luminal B aos restantes.

Também a esterilização das cadelas pareceu traduzir-se numa maior incidência de tumores do subtipo Basal ($p=0.052$). Os tumores do subtipo Luminal B surgiram associados a cadelas com apresentação de tumores isolados ($p=0.058$), por oposição aos restantes subtipos, associados à apresentação de tumores múltiplos.

V 2.1.3.2 Estudo de tumores

De uma amostra de 70 tumores mamários malignos (correspondentes a carcinomas e carcinosarcoma mamários), foi possível fazer a classificação molecular para 68 deles. O carcinosarcoma foi classificado no subtipo Luminal B, 1 carcinoma mamário foi inserido na categoria “Não-Classificado” e, dos restantes carcinomas mamários ($n=66$) a distribuição foi feita entre os diferentes subtipos: 27 (40,91%) carcinomas no subtipo Luminal A, 18 (27,27%) no subtipo Luminal B, 13 (19,69%) no subtipo HER-2 positivo e 8 (12,12%) no subtipo Basal. O subtipo Luminal A foi caracterizado pela negatividade da imunomarcação para HER-2 ($p=0.001$), a positividade de imunomarcação para RP ($p=0.009$) e baixo índice proliferativo de Ki-67 pelas categorizações de Peña ($p=0.000$), ORPHEO ($p=0.000$) e Gama ($p=0.001$).

O subtipo Luminal B foi associado estatisticamente à ausência da marcação para HER-2 ($p=0.013$), a índices proliferativos de Ki-67 elevados ($p=0.000$ para todas as categorizações) e à ocorrência de metastização regional ($p=0.010$). Verificou-se também para este subtipo uma

tendência para a imunopositividade de RP ($p=0.052$), a imunonegatividade a CK5/6 ($p=0.077$) e a existência de necrose intratumoral ($p=0.084$).

Considerando todos os tumores de subtipos Luminais mantém-se o significado estatístico quanto à ausência de imunomarcagem para HER-2 ($p=0.000$) e marcação de RP ($p=0.000$).

Para o subtipo molecular HER-2 foi encontrada apenas uma associação significativa, com o índice proliferativo de Ki-67 considerando o *cut-off* de Gama ($p=0.047$), havendo a tendência para estes apresentarem menor índice proliferativo que os restantes.

Finalmente, o subtipo Basal foi associado à ausência de positividade para RP ($p=0.000$) e aos tipos histopatológicos de carcinomas considerados mais agressivos, os carcinomas de células escamosas ($p=0.011$).

Tabela 9: Distribuição de Classificação Molecular por variáveis clinicopatológicas.

	Classificação Molecular									
	Luminal A		Luminal B		Her-2		Basal			
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
Classificação Histopatológica										
Carcinomas mamários	66	27	40,9%	18	27,3%	13	19,7%	8	12,1%	100,0%
CM complexos	44	19	43,2%	14	31,8%	8	18,2%	3	6,8%	100,0%
CM simples	17	6	35,3%	4	23,5%	5	29,4%	2	11,8%	100,0%
CM de tipo escamoso	5	2	40,0%	0	0,0%	0	0,0%	3	60,0%	100,0%
Carcinosarcoma mamário	1	0	0,0%	1	100,0%	0	0,0%	0	0,0%	100,0%
Carcinomas metastáticos	7	1	14,3%	5	71,4%	0	0,0%	1	14,3%	100,0%
Metástase	1	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	100,0%	100,0%
Grau de malignidade										
Grau I	21	10	47,6%	5	23,8%	3	14,3%	3	14,3%	100,0%
Grau II	31	12	38,7%	11	35,5%	6	19,4%	2	6,5%	100,0%
Grau III	15	5	33,3%	3	20,0%	4	26,7%	3	20,0%	100,0%
Diferenciação mesenquimatosa										
Não	37	16	43,2%	9	24,3%	7	18,9%	5	13,5%	100,0%
Sim	29	11	37,9%	9	31,0%	6	20,7%	3	10,3%	100,0%
Necrose										
Não	55	24	43,6%	13	23,6%	12	21,8%	6	10,9%	100,0%
Sim	12	3	25,0%	6	50,0%	1	8,3%	2	16,7%	100,0%
Infiltração celular linfocítica										
Não	59	24	40,7%	17	28,8%	11	18,6%	7	11,9%	100,0%
Sim	8	3	37,5%	2	25,0%	2	25,0%	1	12,5%	100,0%
Tamanho										
<3	55	22	40,0%	15	27,3%	11	20,0%	7	12,7%	100,0%
3 - 5	9	5	55,6%	2	22,2%	1	11,1%	1	11,1%	100,0%
>5	3	0	0,0%	2	66,7%	1	33,3%	0	0,0%	100,0%
Metastização linfonodos										
Não	54	25	46,3%	10	18,5%	13	24,1%	6	11,1%	100,0%
Sim	7	1	14,3%	5	71,4%	0	0,0%	1	14,3%	100,0%
Estadiamento TNM										
I	41	18	43,9%	8	19,5%	10	24,4%	5	12,2%	100,0%
II	4	1	25,0%	2	50,0%	1	25,0%	0	0,0%	100,0%
III	4	3	75,0%	0	0,0%	1	25,0%	0	0,0%	100,0%
IV	7	1	14,3%	5	71,4%	0	0,0%	1	14,3%	100,0%

Nota: 1 carcinoma mamário “Não-Classificado” não figura na tabela nem foi considerado.

V 2.1.4 Metástases

Das 39 cadelas, para 4 não houve recolha de linfonodos aquando da cirurgia, sendo que para as restantes 35 os linfonodos obtidos foram sempre os retromamários (inguinais superficiais).

Observou-se metastização do processo neoplásico a nível dos linfonodos em 2 (5,71%) das 35 cadelas estudadas. Cada uma delas apresentava vários tumores, sendo que para uma (Cadela 1) foram-lhes atribuídos graus de malignidade de II e III, e para a outra (Cadela 2) de III.

Considerando-se os tumores epiteliais mais malignos de cada uma delas, observamos um carcinoma mamário complexo túbulo-papilífero e um carcinoma escamoso, os dois de grau III de malignidade, o primeiro com diferenciação mesenquimatosa e presença de necrose e, para qualquer um dos dois, a ausência de infiltração celular linfoide ou permeação vascular. Quanto à expressão de marcadores moleculares, os dois tumores apresentam características muito semelhantes: *score* 1+ para HER-2 em ambos, *score* de 3 e 2, respetivamente, para os recetores de progesterona, positividade para CK5/6 (75% de marcação celular para os dois) e índices proliferativos de Ki-67 altos (38,04% e 43,64%, respetivamente). Os dois tumores apresentavam dimensões dentro da categoria T1 (< 3cm). A segunda cadela apresentava ainda um tumor mamário não epitelial, um osteossarcoma mamário com um índice proliferativo alto (48,70%), de tamanho T3. Os linfonodos nos quais se verificou a ocorrência de metastização foram também analisados quando à expressão de marcadores moleculares, não se verificando a conservação das características dos tumores primários nas metastases, como se pode verificar na Tabela 10. Naturalmente, as classificações moleculares foram também divergentes entre os tumores primários e metastases.

Tabela 10: Comparação de parâmetros moleculares entre tumores mamários primários e suas respetivas metastases.

	Classificação histopatológica	Classificação molecular	HER-2	PR	CK 5/6	Ki-67
Cadela 1	Carcinoma mamário túbulo papilífero complexo de grau III de malignidade	Luminal B	1+	3	75	0,3805
	<i>Metástase em linfonodo</i>	<i>Não-classificado</i>	2+	0	1	0,0831
Cadela 2	Osteossarcoma mamário	-	.	.	.	0,4870
	Carcinoma mamário escamoso de grau III de malignidade	Basal	1+	2	75	0,4364
	<i>Metástase em linfonodo</i>	<i>Luminal B</i>	0	3	95	0,3723

Das 39 cadelas objeto de estudo, não houve a realização de quaisquer exames de diagnóstico complementares que permitissem inferir sobre o decorrer de um processo de metastização à distância em 4 delas. Das restantes 35, não houve evidência indubitável de presença de metástases em órgãos distantes.

V 2.2 Análise de tempo de sobrevivência e tempo livre de doença

V 2.2.1 Análise univariada- Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier

Dos 41 animais em relação aos quais se pretendeu fazer estudos para a análise do tempo de tempo de sobrevivência (TS) e do tempo livre de doença (TLD), tiveram de ser descartadas as informações relativas a 11 e 13 animais, respetivamente, por não se verificarem os critérios de inclusão estipulados no início do estudo.

A análise do TS diz respeito a 30 animais, dos quais 9 (30%) morreram ou foram eutanasiados até à data que se considerou o término do seguimento, permanecendo 21 (70%) vivos, sendo por isso censurados. Para a análise TLD, dos 28 animais que fizeram parte do estudo, verificou-se a existência de metastização ou recidiva em 14 deles, sendo os restantes 14 (50%) censurados. O TS médio foi de $18,957 \pm 1,254$ meses (intervalo de confiança 95% para limites inferior e superior, respetivamente, 16,499 e 21,416 meses) e o TLD médio de $16,452 \pm 1,388$ meses (intervalo de confiança 95% para limites inferior e superior, respetivamente, de 13,732 e 19,172 meses). Decorridos 6 meses da cirurgia 86,7% dos animais (n=26) encontravam-se vivos, 82,1% (n=23) livres de doença e aos 12 meses 80,0% (n=24) dos animais encontravam-se vivos e 67,9% (n=19) livres de doença.

Encontra-se disponível na Tabela 11 o resumo dos valores de prova e o TS e o TLD (em meses) descritos nos capítulos que se seguem, referentes às características que apresentaram valores considerados de relevância. Não são facultados todos os resultados, dada a grande extensão de encontrados, optando-se por apresentar apenas os analisados e discutidos.

V 2.2.1.1 Tempo de sobrevivência (TS)

O tamanho do tumor foi significativamente associado ao tempo de sobrevivência, quer assumindo a sua categorização como preconizada pela OMS (p=0,047), quer dicotomizando os tumores em maiores ou menores de 3 cm (p=0,014). Considerando esta última temos para os tumores de tamanho < 3 cm uma sobrevivência média de $20,737 \pm 0,686$ meses e para os tumores

de tamanho ≥ 3 cm uma sobrevivência média de $14,455 \pm 2,647$ meses. Da divisão dos tumores considerando os 5 cm, os tempos de sobrevivência para animais representados por tumores de tamanho > 5 cm e ≤ 5 cm foram, respectivamente $15,750 \pm 3,830$ meses e $18,721 \pm 1,219$ meses ($p=0.295$).

A categorização de Peña para o índice de Ki-67 resultou também numa associação com significado estatístico ($p=0,038$), contudo não foi possível chegar a uma conclusão linear, já que os tumores de índice proliferativo intermédio apresentaram uma média de sobrevivência superior quer aos tumores de índice baixo quer aos de índice mais elevado. À semelhança do que havia sido feito para outras associações, a dicotomização adicional em tumores de índice proliferativo inferior ou igual a 25% e superior já permitiu encontrar uma tendência por análise de tempos médios de sobrevivência ($20,077 \pm 1,238$ meses e $14,000 \pm 3,156$ meses respectivamente), embora aqui não se possa falar de uma associação estatisticamente significativa ($p=0.071$). Para nenhum dos outros *cut-off* de Ki-67 considerados se encontraram resultados com significado estatístico, embora a tendência tenha sido sempre de maior tempo de sobrevivência para os menores índices proliferativos: para *cut-off* de ORPHEO temos $p=0.600$ e TS de $19,179 \pm 1,314$ meses para Ki-67 baixo e $17,429 \pm 2,192$ meses para alto e, para *cut-off* de Gama, $p=0.989$ com TS de $18,698 \pm 1,492$ meses para Ki-67 baixo e $18,125 \pm 1,972$ meses para alto.

Todas as restantes associações ficaram aquém dos valores necessários para que fossem consideradas significativas a nível estatístico mas, ainda assim, permitem inferir algumas tendências a nível de prognóstico.

O tempo de sobrevivência do animal no qual foi detetado um processo de metastização regional (12,000 meses) foi muito inferior ao dos animais nos quais se verificou a existência apenas do processo neoplásico primário ($19,565 \pm 1,239$ meses) ($p=0,064$).

A análise de sobrevivência quanto ao estadiamento TNM ($p=0,241$) permitiu chegar a resultados diferenciais para cada estadio, nomeadamente: $20,000 \pm 1,027$ meses para estadio I, $15,333 \pm 5,443$ meses para estadio II, $14,800 \pm 3,537$ meses para estadio III e $12,000 \pm 0.000$ para estadio IV. Separando os animais em pertencentes aos estádios I e II ou aos estádios III e IV este diferencial torna-se ainda mais significativo ($p=0.080$) com sobrevivências médias de $19,067 \pm 1,447$ meses e de $14,333 \pm 2,978$ meses, respectivamente.

Quanto ao tipo histológico ($p=0,081$) verificaram-se diferenças entre as sobrevivências médias dos animais representados por carcinomas de tipo complexo ($20,917 \pm 0,721$ meses) e carcinomas de tipo simples ($15,692 \pm 2,397$ meses). A cadela representada pelo osteossarcoma, na qual se verificava já a ocorrência de metastização a nível dos linfonodos, teve uma sobrevivência de 12 meses. A cadela representada pelo carcinosarcoma foi eutanasiada por

razões alheias à doença em estudo pelo que não foi considerada nos estudos de sobrevivência. Das 3 cadelas representadas por carcinomas escamosos apenas uma reuniu os critérios de inclusão para os estudos de sobrevivência, verificando-se, à altura do término do estudo, a ausência de recidiva ou morte.

Considerando o grau de malignidade ($p=0.388$) as sobrevivências médias foram de $20,875\pm 1,988$ meses para grau I, $19,000\pm 1,458$ meses para grau II e $14,286\pm 3,154$ meses para grau III de malignidade ($p=0.388$).

O estudo da sobrevivência quanto à ocorrência ou não de infiltração celular linfocítica permitiu chegar a um resultado quase significativo ($p=0.056$), com a infiltração linfocítica a surgir como fator de prognóstico negativo (sobrevivência de $12,200\pm 3,526$ meses vs. $20,028\pm 1,185$ meses para casos representados por tumores sem infiltração).

Verificou-se uma tendência de melhor prognóstico nos tumores malignos com diferenciação mesenquimatosa que que nos tumores sem ela ($p=0,110$).

A análise de TS considerando a existência de necrose intratumoral não permitiu chegar a quaisquer conclusões ($p=0.946$).

As cadelas não submetidas a OVH apresentaram tempos de sobrevivência superiores às esterilizadas, com um p de 0.196: $19,811\pm 1,251$ meses para cadelas inteiras e $12,250\pm 4,407$ meses para cadelas esterilizadas. Por outro lado, a realização de OVH simultânea à mastectomia surgiu sem significado como fator de prognóstico em termos de TS ($p=0.890$) mas revelando uma tendência em termos de TLD ($p=0.067$), parecendo exercer um efeito nefasto.

Particularizando agora a análise aos marcadores moleculares, os animais com tumores representativos RP negativos apresentaram um tempo médio de sobrevida ($16,667\pm 2,874$ meses) inferior aos animais com tumores positivos ($18,282\pm 1,443$ meses); $p=0.847$.

O tempo médio de sobrevivência para os animais com tumores HER-2 positivos foi de $13,250\pm 2,678$ meses, inferior ao tempo dos animais com tumores HER-2 negativos ($18,591\pm 1,383$ meses); $p=0.274$. A positividade ou negatividade às CK5/6 condicionou tempos de sobrevida de, respetivamente, $18,149\pm 1,366$ meses e $16,000\pm 0.000$ meses; $p=0.196$.

Finalmente, considerando os 8 animais para os quais foi possível o estabelecimento de uma classificação molecular, a distribuição foi equitativa pelos quatro tipos, com 2 (25,00%) das cadelas a representar cada um deles.

Os tempos médios de sobrevivência foram: $19,375\pm 1,879$ meses para Luminal A; $19,111\pm 2,111$ meses para Luminal B; $13,250\pm 2,678$ meses para HER-2 + e $15,800\pm 3,315$ meses para Basal; $p=0.622$.

V 2.2.1.2 Tempo livre de doença (TLD)

Como fatores de prognóstico estatisticamente significativos a análise univariada permitiu apenas considerar o tamanho ($p=0.034$), verificando-se a recidiva/metastização mais precocemente em animais com tumores de diâmetro de eixo maior superior ou igual a 3 cm ($12,727\pm 2,378$ meses) do que nos de tamanho igual ou inferior ($18,235\pm 1,298$ meses). Também considerando como 5 cm o tamanho tumoral de referência se verificam tempos livres de doença superiores nos tumores de tamanho inferior ($16,487\pm 1,405$ meses) que nos de tamanho superior ($13,000\pm 3,240$ meses), embora aqui já não com o mesmo nível de significância ($p=0.176$). No geral, considerando os tamanhos referência da OMS, a significância calculada foi intermédia ($p=0,100$). As outras variáveis serão então avaliadas em termos de tendência de prognóstico, nomeadamente pelos tempos livres de doença médios, já que não têm significado estatístico. Para os animais que haviam realizado OVH manteve-se a tendência de maior TLD para as inteiras ($p=0.634$), embora para as que a realizaram simultaneamente à mastectomia se tenha revelado uma tendência ($p=0.067$) de maior demora na recidiva da doença (não permitindo os dados, no entanto, fornecer estatísticas em termos médios desses tempos pelo número de casos censurados, inferindo-se apenas por análise de curva).

Nos animais em que já se verificava um processo de metastização ($p=0.143$) a nova recidiva ocorreu mais rapidamente do que naqueles em que os linfonodos permaneciam inalterados ($11,000\pm 0.000$ meses vs. $17,151\pm 1,446$ meses). O estadiamento TNM ($p=0.362$) dos animais permitiu chegar a valores médios de tempo livre de sobrevivência menores à medida que se avança no estadio: estadio I com tempo médio de $17,200\pm 1,554$ meses; estadio II com $15,333\pm 5,443$ meses; estadio III com $13,200\pm 3,091$ meses e estadio IV com $11,000\pm 0.000$ meses. Quanto à classificação histológica ($p=0,196$) parece manter-se a tendência de um maior TLD para tumores complexos ($18,091\pm 1,301$ meses) que para simples ($13,462\pm 2,341$ meses). A cadela representada pelo osteossarcoma apresentou recidiva aos 11 meses e a representada pelo carcinoma de células escamosas não apresentou qualquer evidência de recidiva até ao término do estudo.

Para o grau de malignidade ($p=0.776$), os TLD foram maiores nos animais com tumores de grau histológico de malignidade II ($17,091\pm 1,765$ meses) seguidos de grau I ($15,286\pm 2,723$ meses) e de grau III ($13,857\pm 3,047$ meses). A infiltração celular linfocítica mostrou bastante relevância pelo nível de significado estatístico ($p=0,057$), verificando-se um tempo livre de doença bastante superior nos animais com tumores sem infiltração linfocítica ($17,390\pm 1,461$ meses) do que com infiltração ($10,600\pm 2,975$ meses). A análise de sobrevivência considerando a existência de necrose intratumoral não permitiu mais uma vez chegar a quaisquer conclusões

($p=0.918$) e para a diferenciação mesenquimatosa manteve-se a tendência de maior tempo livre de doença quando presente ($p=0.419$).

Para os índices proliferativos de Ki-67, o TLD foi superior nos tumores com índice proliferativo maior, para todos os *cut-off*. Para Peña, com um $p=0.169$, temos $17,175\pm 1,448$ meses *versus* $11,500\pm 3.348$ meses; para ORPHEO, com um $p=0.224$ temos $17,167\pm 1,787$ vs. $14,429\pm 2,042$ e, para Gama, com um $p=0.447$ temos $16,816\pm 1,572$ vs. $14,333\pm 2,355$.

Os animais representados por tumores RP negativos apresentaram um TLD ($15,800\pm 3,315$ meses) ligeiramente superior aos animais com tumores positivos ($15,132\pm 1,559$ meses), com $p=0.513$. O TLD para animais com tumores HER-2 positivos foi de $13,250\pm 2,678$ meses, inferior ao tempo dos animais com tumores HER-2 negativos ($15,450\pm 1,571$ meses), com $p=0.941$. A positividade ou negatividade às CK5/6 condicionou os TLD de, respetivamente, $15,636\pm 1,482$ meses e $10,000\pm 0.000$ meses, com $p=0.153$. Os TLD para os diferentes subtipos moleculares tumorais foram: $15,250\pm 2,262$ meses para o Luminal A; $15,875\pm 2,465$ meses para o Luminal B; $13,250\pm 2,678$ meses para o HER-2 + e $14,500\pm 3,881$ meses para o Basal.

Tabela 11- Resumo de valores de prova, de TS e de TLD para as variáveis analisadas

Variáveis		TS		TLD	
		p	Tempo (meses)	p	Tempo (meses)
Status reprodutivo	inteira	0.179	19,811	0.634	17,359
	OVH		12,250		12,250
OVH simultânea à Mastectomia	não	0.890	14,653	0.067	b)
	sim		12,000		b)
Tamanho (OMS)	T1	0.047	20,737	0.100	18,235
	T2		13,286		12,286
	T3		15,750		13,000
	< 3cm	0.014	20,737	0.034	18,235
	≥ 3cm		14,455		12,727
	≤ 5 cm	0.295	18,721	0.176	16,487
>5 cm	15,750		13,000		
Classificação Histopatológica	carcinoma complexo	0.081	20,917	0.196	18,091
	carcinoma simples		15,692		13,462
	osteosarcoma	a)	12,000	a)	11,000
Grau Histológico	I	0.388	20,875	0.776	15,286
	II		19,000		17,091
	III		14,286		13,857
Necrose	ausência	0.946	18,717	0.918	15,765
	presença		17,700		16,200
Infiltração	ausência	0.056	20,028	0.057	17,390
	presença		12,200		10,600
Diferenciação mesenquimatosa	ausência	0.110	17,083	0.419	14,875
	presença		20,077		17,636
Metastização regional (linfonodos)	ausência	0.064	19,565	0.143	17,151
	presença		12,000		11,000
Estadiamento TNM	I	0.241	20,000	0.362	17,200
	II		15,333		15,333
	III		14,800		13,200
	IV		12,000		11,000
	I + II	0.080	19,067	0.134	16,769
	III + IV		14,333		12,833
Ki-67 Peña tricotómica	<10%	0.038	14,500	0.363	14,000
	10% - 25%		21,188		17,600
	>25%		14,000		11,500
Ki-67 Peña	<25%	0.071	20,077	0.169	17,175
	>25%		14,000		11,500
Ki-67 ORPHEO	<20%	0.600	19,179	0.447	16,816
	>20%		17,429		14,333
Ki-67 Gama	≤ mediana	0.989	18,698	0.224	17,167
	>mediana		18,125		14,429
RP	negativo	0.847	16,667	0.513	15,800
	positivo		18,282		15,132
HER-2	negativo	0.274	18,591	0.941	15,450
	positivo		13,250		13,250
CK5/6	negativo	0.196	16,000	0.153	10,000
	positivo		18,149		15,636
Classificação Molecular	Luminal A	0.622	19,375	0.986	15,250
	Luminal B		19,111		15,875
	Her-2		13,250		13,250
	Basal		15,800		14,500

a) Pelo facto de ser o único representante do tipo histológico não se usou em associação com variáveis de TS e TLD.

b) O número de casos censurados não permitiu chegar a um valor numérico estatístico de TS e TLD. Gradação de cinzentos evidencia valor estatístico de associações: estatisticamente significativas e tendenciais.

Capítulo VI – Discussão

VI 1. Caracterização tumoral e estudo de prognóstico de acordo com variáveis epidemiológicas e clinicopatológicas

VI 1.1 Estudo descritivo

Com o objetivo de caracterizar os tumores mamários malignos caninos, para além de se ter procedido à determinação dos seus perfis moleculares, importou conhecê-los e descrevê-los primariamente a partir da forma como têm sido historicamente caracterizados, ou seja, de uma perspetiva clínica e anatomopatológica. O aparecimento de um novo paradigma na forma de reconhecer estes tumores vem, ao invés de demarcar caminhos divergentes, abrir novos caminhos de conhecimento pela articulação entre os já trilhados e os que agora se revelam. Assim, não sendo preferencial objetivo deste estágio uma caracterização em termos epidemiológicos ou mesmo clinicopatológicos, são estas as características, muito mais amplamente estudadas, que vão surgir como elo de ligação e *tradução* ao que se consegue inferir desta nova forma de avaliar os tumores mamários.

Iniciando-se a análise pelo estudo de casos e considerando os tumores representativos de cada animal, o número de cadelas com apresentação de patologia maligna foi em muito superior ao número de cadelas com neoplasia exclusivamente benigna, contrariando os resultados dos estudos citados na revisão bibliográfica (41 a 53%) (Misdorp et al., 2002; Gupta et al., 2012). Estes resultados poderão ser justificados pela influência que a situação socioeconómica terá na celeridade com que os donos, detetando no seu animal um sinal de doença que, nas suas fases iniciais de desenvolvimento não compromete grandemente a normalidade do seu comportamento, acorrem com este ao veterinário. Sendo de conhecimento geral a importância da cirurgia como primeira linha de tratamento nos processos tumorais e tratando-se esta de um procedimento considerado oneroso para uma boa parte dos donos, a identificação ou consciencialização para a resolução do problema tende a ser adiada (Zuccari et al., 2008). É também bastante evidente, quer pela consulta da história clínica dos animais, quer por experiência anterior em contexto hospitalar que, frequentemente, *é o próprio clínico* o responsável pela deteção de massas mamárias no decurso do exame de estado geral, quando o dono procurou afinal os serviços veterinários motivado pela existência de uma outra afeição, com sinais de mais premente resolução. O atraso em relação ao diagnóstico de patologia mamária pode traduzir-se numa transformação maligna de doenças que inicialmente teriam um diagnóstico e prognóstico muito mais favoráveis (Antuofermo et al, 2007; Stratmann et al.,

2008; Sorenmo et al., 2009; Mouser et al., 2010). A idade de ocorrência da doença mamária (média de 11 anos) verificou-se dentro dos intervalos documentados (Palta et al., 2000; Gupta et al., 2008; Gupta et al., 2012; Sennazli et al., 2015) tal como a ocorrência de multiplicidade e bilateralidade de tumores (Sorenmo et al., 2003; Sorenmo et al., 2009; Im et al., 2013). Nos estudos que englobam cães apresentados a consulta, são normalmente os de raça indeterminada quem apresenta a maior incidência de tumores mamários em termos absolutos, talvez pelo facto de serem também os que existem em maior número e os mais acessíveis a qualquer dono. Apesar de na maior parte dos estudos se verificar uma maior prevalência nas cadelas de raça pura, justificando a raça como fator de risco (Dorn et al, 1968; Gupta et al., 2012), julgamos que uma justificação cabal para a equidade casuística no nosso estudo será, precisamente, a especificidade da população de cães existente na área em termos raciais. Verificaram-se os padrões raciais documentados como de maior risco. Também em relação a outras variáveis analisadas, a amostra de cadelas presentes no estudo poderá não ser representativa da população, mas filtrada pela disponibilidade económica. Nesse sentido, poder-se-á encontrar uma relação entre a pureza da raça (sendo que estas são muitas vezes obtidas por aquisição comercial) com a opção de realização eletiva de OVH e com a procura dos serviços veterinários numa fase mais precoce da doença. De facto, as cadelas de raça pura e indeterminada constituem dois grupos distintos ($p=0.016$) quanto ao *status* reprodutivo, tendo as de raça pura sido significativamente mais submetidas a este procedimento cirúrgico. De uma amostra praticamente equitativa em termos de incidência destes tumores em cadelas de raça pura ou indeterminada, resultou que os tumores de menores dimensões pertenceram tendencialmente às cadelas de raça pura e nestas o aparecimento (que pode ser interpretado como deteção) de tumores se deu a idades mais precoces. Ainda assim, a média de idades de aparecimento de tumores mamários em cadelas ovariectomizadas foi ligeiramente superior à das inteiras. A salientar o facto de, apesar de alguns donos considerarem a OVH conveniente ou benéfica, as *particularidades* do seu papel protetor quanto ao aparecimento de patologia mamária não é conhecido, uma vez que para nenhuma das cadelas esta se realizou no período em que constituiria uma diminuição do risco de doença (antes dos 2 anos e meio de idade). De facto, nos estudos de sobrevivência, as cadelas inteiras apresentam maiores TS e TLD, embora o nível de significância estatística nos leve a descartar o valor destas informações como relevantes. Também a realização de OVH como procedimento contemporâneo à mastectomia não permitiu chegar a conclusões relativamente à influência no TS, mas parece ser de alguma forma tendencialmente nefasta em relação ao reaparecimento da doença (por análise de curva, Anexo F), indo ao encontro de alguns estudos previamente publicados (Morris et al., 1998; Philibert et al., 2003).

A ocorrência de metastização em linfonodos foi, naturalmente, estatisticamente associada ao estadio TNM IV ($p=0.002$). Verificou-se, no entanto, que existe já esta tendência de associação, a nível quase significativo ($p=0.052$), para animais de estadio superior a II. Para nenhuma destas variáveis se encontraram, nos estudos de sobrevivência, associações com valor estatístico significativo que permitam defini-las claramente como fatores de prognóstico, embora a análise dos TS e TLD permita tirar ilações sobre o seu significado que vão de encontro ao documentado e expectável. A existência de doença metastática à altura do diagnóstico está associada a um tempo de sobrevivência inferior em mais de 6 meses à que se verifica nos animais nos quais apenas se detetou a existência do tumor primário, mantendo-se o mesmo diferencial temporal quanto à tendência de recidiva. Também analisando a sobrevivência dos animais de acordo com o estadiamento TNM, este mostra ser uma boa ferramenta de prognóstico pela forma como permite escalonar as expectativas de sobrevivência e tempo livre de doença. A referir que, pela divisão dicotómica do estadiamento em estadios igual ou inferior a II vs. superior a II, cuja condicionante de integração numa e noutra divisão é primeiramente o tamanho tumoral (≤ 5 cm ou > 5 cm) e considerando que a ocorrência de metastização é representada por apenas dois casos, se confirmou a importância da avaliação do tamanho na definição do prognóstico, quer pelo nível de associação com a metastização presente no momento do diagnóstico (como vimos), quer pelo nível de significado estatístico considerando a análise de TS ($p=0.080$).

Na análise que considerou a totalidade dos tumores, confirmou-se a sua maior prevalência nas glândulas mamárias localizadas mais caudalmente (Peleteiro et al., 1993b; Misdorp et al., 2002, Sorenmo et al., 2009), o que se atribui ao maior crescimento, peso, lobularidade, secreção e frequência de nódulos hiperplásicos nestas glândulas. O tamanho tumoral médio foi também de encontro ao citado na literatura (Quaresma, 2008), assim como a frequência de diferenciação mesenquimatosa (Cassali et al., 2012). A ausência de permeação vascular pode ser atribuível ao facto de a sua identificação estar dependente da análise a um único corte do tumor, isto é, uma porção ínfima da área tumoral (tanto mais ínfima quanto maior o tumor).

VI 1.2 Estudo associativo

Em termos de prognóstico vários fatores têm sido repetidamente confirmados como influentes, constituindo-se alguns como fatores independentes de prognóstico em vários estudos de análise multivariada. Alguns dos reiteradamente consensuais são o tamanho tumoral (De las Mulas et al., 2005, Santos et al., 2015), o tipo histológico (Hellmén et al., 1993), o grau histológico (Peña et al., 1998; Sarli et al., 2002; Karayannopoulou et al., 2005), a metastização a nível de

linfonodos (Pérez-Alenza et al., 1997; Nieto et al., 2000) e o estadiamento clínico TNM (Sorenmo et al., 2013; Cassali et al., 2014).

Adicionalmente outros fatores têm vindo a ser estudados e, não sendo tão consensual o seu valor prognóstico, à medida que os estudos se tornam mais abundantes vão sendo gradualmente mais considerados. Entre estes estão a necrose intratumoral (De las Mulas, 2005), a infiltração linfocítica (Kim et al., 2013), a diferenciação mesenquimatosa (Cassali et al., 2012) e a identidade imunofenotípica, identificada pela expressão de marcadores moleculares bem como a respetiva classificação molecular (Santos et al, 2013; Im et al, 2014). Numa primeira fase procurou-se relacionar as variáveis mais amplamente estudadas. O tamanho tumoral foi associado significativamente com a necrose intratumoral e com a ocorrência de infiltração celular linfocítica. Sendo numerosos os estudos que associam um maior tamanho tumoral a um pior prognóstico (Bostock, 1975; Else & Hannant, 1979; Kurzman & Gilbertson, 1986; Schofer et al., 1989; Hellmén et al, 1993; Yamagami et al; 1996; Peña et al., 1998; Philibert et al., 2003), a necrose intratumoral é já também, um critério assente para a definição de malignidade (Goldshmidt et al, 2011), estando associada a uma elevada taxa de crescimento de tumores malignos (condicionante da necrose isquémica). Estas características estão então não apenas estatisticamente associadas mas causalmente relacionadas (razão pela qual em estudos multivariados, onde a necrose entra como variável, em se afirmando o tamanho tumoral como fator de prognóstico independente, a necrose não o é). Realçamos o facto de esta relação se manter estatisticamente significativa independentemente do tamanho considerado ($p=0.004$ para *cut-off* de 3 cm e $p=0.016$ para *cut off* de 5 cm).

Os tumores da categoria T1 (<3 cm) foram associados a melhores TS ($p=0.014$) e TLD ($p=0.034$), permitindo a sua estratificação relativamente a estes parâmetros (aproximadamente 6 meses de diferença para ambos). Resultados muito semelhantes foram reportados por Santos et al. (2015). No nosso estudo, também considerando os tumores T3 (>5cm), se verificaram diferenças em relação a ambos os parâmetros, na continuidade da tendência de pior prognóstico com o aumento de tamanho, embora estas diferenças não tenham já sido significativas, e com diferenças em termos de tempos de aproximadamente 3 meses.

A necrose intratumoral, por sua vez, não permitiu a divisão em grupos significativamente diferentes nos estudos de sobrevivência, tal como havia acontecido nos estudos de Santos (2013). Tendo este parâmetro sido significativamente associado a outros documentados como de mau prognóstico e, mesmo neste estudo, especificamente com o tamanho (fator de prognóstico mais forte), julgamos que o critério de escolha dos tumores representativos de cada animal bem como a pequena dimensão da amostra poderão justificar estes resultados. Em vários estudos, o critério de seleção do tumor é o tamanho deste sendo que, no nosso estudo, tumores

mais pequenos foram escolhidos em detrimento de maiores, por apresentarem características histopatológicas consideradas de maior malignidade.

Também a infiltração linfocítica foi anteriormente associada à capacidade invasiva e à progressão tumoral, bem como a um menor TS (Kim et al., 2013). Em relação ao tamanho, é na divisão dos tumores em maiores ou menores que 3 cm que esta associação se verifica com mais significado ($p=0.037$ para 3 cm e $p=0.087$ para 5 cm), sendo as duas variáveis influentes no mesmo sentido em termos de prognóstico e relacionando-se em sentido direto. As diferenças de prognóstico em termos de TS e TLD estão muito próximas da significância estatística, estando a infiltração linfocítica não apenas associada a menor TS ($p=0.056$ com diferença aproximada de 8 meses) mas também a um menor TLD ($p=0.057$ com diferença aproximada de 7 meses). Verificou-se a tendência, embora sem significado estatístico, para os tumores de classificação histopatológica considerada mais maligna apresentarem maior tamanho à altura do diagnóstico, o que se pensa estar associado a uma maior taxa de crescimento destes. Também aqui o *cut-off* de 3 cm permitiu resultados com maior significado estatístico. Já com a infiltração linfocítica, esta encontrou-se significativamente associada aos tipos histológicos de maior malignidade ($p=0.024$) quando considerados apenas os carcinomas epiteliais, sendo a tendência de ocorrência de infiltração sucessivamente decrescente dos carcinomas de células escamosas para os simples e para os complexos. No estudo de Kim (2013) este não conseguiu encontrar uma associação estatisticamente significativa entre o grau da infiltração linfocítica e tipo histológico mas, tal como no nosso estudo, verificou que o grau mais elevado de infiltração era mais frequente nos carcinomas de células escamosas. Entre tipos histológicos diferentes, as diferenças mais assinaláveis em termos de sobrevivência foram relativas à comparação entre carcinomas de tipo simples e complexo, sendo mais significativas relativamente ao TS ($p=0.081$) que ao TLD ($p=0.196$). Para ambos se confirmou um melhor prognóstico para os complexos, que se julga estar relacionado com o papel protetor que a componente mioepitelial confere a este tipo de neoplasia, pela supressão de proliferação e invasão tumoral (Santos et al., 2013).

Para as associações do grau de malignidade com outras variáveis patológicas, o grau III de malignidade parece assumir-se como melhor *cut-off* de separação de grupos, permitindo encontrar uma tendência, com valor estatístico significativo ($p=0.041$), de atribuição deste aos tipos histopatológicos considerados mais malignos (carcinoma de células escamosas e carcinosarcoma). Considerando-se as duas subdivisões dicotómicas entre carcinomas (simples e complexos *vs.* tipos especiais *ou* simples *vs.* complexos), verificou-se uma tendência, próxima do nível significativo, para os carcinomas de maior malignidade apresentarem maior grau histológico ($p=0.070$ e $p=0.065$ respetivamente). Esta melhor adequabilidade da separação dos

tumores em grau I + II versus III não é inédita, havendo já sido utilizada por vários autores (Karayannopoulou., et al., 2005; Santos et al., 2013; Santos et al., 2015), de forma de encontrar significado estatístico para associações univariadas relativas ao grau histológico. Julga-se que o que estará na base desta diferença será a necessidade de uma melhor “calibração” ao sistema de atribuição de grau histológico aos tumores mamários caninos, já que se trata ainda de uma adaptação, talvez ainda algo incipiente, de um sistema desenhado para caracterizar os tumores mamários humanos (Santos et al., 2015). Não existem ainda estudos prospectivos suficientes para que se considere um método de atribuição de grau histológico a TMC universalmente aceite.

Uma das associações mais expressivas foi a do grau histológico com a necrose tumoral, sendo aqui indiferente, para a ocorrência de significado estatístico, a dicotomização considerada ($p=0.000$ na divisão I+II vs. III e $p=0.026$ na divisão I vs. II+III), corroborando o papel da necrose na identificação da malignidade anteriormente proposto por Goldschmidt et al. (2011). Uma outra associação significativa encontrada foi a da maior ocorrência de diferenciação mesenquimatosa nos tumores de graus I e II de malignidade, estando a sua ausência associada aos tumores de grau III de malignidade ($p=0.031$). Este resultado corrobora estudos anteriores (Yamagami, Kobayashi, Takahashi & Sugiyama, 1996; Cavalcanti et al., 2006; Cassalli et al, 2012) nos quais os carcinomas em tumores benignos mistos foram associados a uma sobrevivência média 2 a 3 vezes superior a outros carcinomas mamários caninos, constituindo-se como fator de prognóstico positivo e considerando-se um fator de proteção contra o risco de morte associada à neoplasia. Também nos nossos estudos de sobrevivência se verificou um maior TS nos tumores com diferenciação mesenquimatosa, ($p=0.110$), mas com uma sobrevivência superior em apenas 3 meses (de 17 para 20 meses).

Apesar de sem significado estatístico ($p=0.070$), verificámos uma maior tendência de ocorrência de infiltração celular linfocítica nos tumores de grau III de malignidade, o que vai ao encontro do potencial maligno desta característica já descrito. Quanto ao desenvolvimento de metástases regionais, a sua ausência foi associada aos tumores de grau I de malignidade, com uma maior tendência de metastização associada aos tumores de grau II e III ($p=0.085$), tal como havia sido descrito no estudo de Peña et al. (2013). Os estudos de sobrevivência permitiram confirmar a diminuição do TS com o aumento do grau de malignidade, embora sem significado estatístico.

VI 2. Caracterização de metástases

Para os dois casos nos quais houve metastização para os linfonodos regionais não se verificou a conservação de características imunofenotípicas dos tumores primários para as metástases identificadas e analisadas, à semelhança do que acontece para a mulher (Falck, Ferno, Bendahl & Rydén, 2013). Esta ausência de similaridade verificou-se quer em termos de marcação individual de marcadores quer em termos de classificação molecular considerada. Sendo para muitos autores a via hematogena a considerada a preferencial na disseminação de células neoplásicas para os sarcomas mamários, estudos recentes evidenciaram que existe afinal uma similaridade nas formas de disseminação linfática e hematogena (Hellmén, 2014), pelo que este tumor é também considerado para comparação, como possível fonte de células responsáveis pela metastização no linfonodo.

As explicações para as diferenças de características entre os tumores primários e as lesões secundárias a estes fogem um pouco ao âmbito desta dissertação que, já por si, se revela algo extensa, pelo que deixamos apenas uma sugestão de investigação a este propósito no sentido de verificar se, tal como na mulher, o perfil das lesões metastáticas tende a apresentar maior agressividade. Como último apontamento notamos que, entre os tumores primários epiteliais que terão estado na base do processo metastático, existe como elemento comum a evidência de uma elevada taxa proliferativa pelo índice de Ki-67, uma imunomarcacão pouco expressiva do recetor hormonal analisado e uma elevada expressão da CK5/6, características consideradas apanágio de agressividade tumoral.

VI 3. Caracterização tumoral e estudo de prognóstico de acordo com imunoexpressão de marcadores moleculares

VI 3.1 Ki-67

O Ki-67 tem sido o marcador estudado mais exaustivamente para a avaliação da proliferação celular tumoral. Apesar de alguns autores (Thomas et al., 1993; Gasparini et al., 1994;) reportarem resultados inconsistentes quanto ao seu valor prognóstico no cancro da mama na mulher, este foi validado desde muito cedo em vários estudos de análise univariada (Barnard, Hall, Lemoine & Kadar, 1987; Vielh et al., 1990; Leonardi et al., 1992; Kadtur et al., 2011), tendo mesmo sido considerado, por análise multivariada, um fator independente de prognóstico (Wintzer et al., 1991; Tahan, Neuberg, Dieffenbach & Yacoub et al., 1993; Veronese et al., 1993; Peña et al., 1998; Ferreira et al., 2009; Santos et al., 2013). Os resultados obtidos de

estudos relacionados com os TMC têm sido consistentes com os obtidos para a mulher, particularmente em relação à forma como a avaliação do seu índice proliferativo se associa com outras variáveis clinicopatológicas, com maior ou menor valor prognóstico, e os estudos de sobrevivência.

Neste estudo, utilizando a divisão tricotômica de Peña, o índice de Ki-67 foi associado significativamente com a sobrevivência ($p=0.038$), apesar do TS no grupo proliferativo intermédio ser superior ao dos tumores de índices baixo e alto, sucessivamente. Passando à análise considerando o *cut-off* 25%, os animais com tumores de índice proliferativo mais baixo apresentaram um tempo de sobrevivência aproximadamente seis meses superior aos animais com tumores de índices proliferativos mais elevados ($p=0.071$). Esta diferença dilui-se à medida que se considera um menor valor de *cut-off*. Para os TLD as tendências são sensivelmente as mesmas, embora aqui não se encontrem valores estatisticamente significativos para nenhuma das variações utilizadas.

O facto de o número de animais representados por tumores de índice proliferativo intermédio (Peña) ser muito superior, quer ao de tumores de índices altos quer de baixos, pode estar na base da distribuição de sobrevivência que começámos por analisar. Uma outra razão poderá ser a inadequação, ainda, do valor de *cut-off* considerado. Não existe ainda um consenso quanto ao valor *cut-off* a utilizar neste tipo de estudos, que variam grandemente entre eles como temos vindo a verificar. O facto de se ter escolhido um tumor de entre vários num animal para o representar é também sempre, em si, um facto a ter em consideração. Será que se o critério de escolha do tumor para cada animal que apresentava múltiplos tivesse sido o maior índice de Ki-67, haveria diferenças a assinalar nos resultados? E qual seria, nesse caso, a influência que essa escolha teria na relação de associação entre todas as restantes variáveis e restantes estudos de distribuição e de sobrevivência? O facto de existir uma tão grande heterogeneidade tumoral aliado ao facto de ser tão comum a apresentação de tumores múltiplos em cadelas traduz-se na necessidade de uma escolha de critérios que vai, absolutamente, condicionar todos os resultados subsequentes. Como chegar a uma unanimidade de critério para a escolha do tumor representativo? Neste estudo assumimos, com base nos resultados dos tempos de sobrevivência, que o elevado índice proliferativo Ki-67 representa um fator de prognóstico negativo.

A associação da pureza da raça com menores índices proliferativos poderá estar relacionada com fatores já anteriormente discutidos, nomeadamente o facto de as cadelas de raça pura serem significativamente diferentes no que diz respeito ao seu *status* reprodutivo (esterilizadas) e apresentarem uma tendência de apresentação de tumores de menores dimensões.

A variável em relação à qual se estabeleceu uma relação de interdependência mais expressiva foi o tamanho, sendo evidente, pela análise descritiva, o aumento do índice de Ki-67 com o

aumento do tamanho tumoral. Estatisticamente, foram procuradas associações de 6 formas diferentes: dividindo duplamente os tumores em maiores ou menores que 3 cm e maiores ou menores que 5 cm, e utilizando para cada uma das divisões três *cut-off* diferentes de proliferação. Encontraram-se associações significativas em 5 destas 6 combinações, sendo que na exceção se continua a verificar a associação, apesar de não ser significativa estatisticamente. Estes resultados justificam-se plenamente pelo facto de este marcador ser altamente específico da proliferação celular, indo de encontro aos resultados de vários estudos (Ferreira et al., 2009; Sorenmo et al., 2009), tanto para a espécie canina como para a humana (Wintzer et al., 1991), onde se verificou esta mesma relação, apesar de não simultaneamente para vários *cut-off* e limiares de tamanhos.

Também em termos da relação com o tipo histológico, a marcação obtida para o Ki-67 permitiu confirmar o seu valor na avaliação da taxa de crescimento de populações celulares, nomeadamente pela comparação das médias obtidas no tecido mamário normal (2,74%), nas ectasias ductais (3,01%), no adenoma mamário (18,99%) e nos tumores mamários malignos (21,00%). Como expectável, o índice proliferativo apresentou um crescendo com a malignidade dos tecidos. A existência de uma diferença pouco considerável entre o adenoma e os tumores malignos pode ser justificada quer pela desigualdade dos tamanhos da amostra das duas categorias, quer pela grande heterogeneidade encontrada a nível dos tumores malignos.

Dentro dos TMC e, considerando valores médios quanto aos tipos histológicos, os tumores com o índice de Ki-67 mais elevado foram o osteossarcoma e o carcinosarcoma (48,70% e 25,56%, respetivamente), aos quais se seguiram os carcinomas simples (21,02%), os carcinomas complexos (19,96%) e os carcinomas de células escamosas (19,79%). O carcinoma anaplásico apresentou, dentro dos carcinomas simples, um índice proliferativo muito elevado (58,74%). Nos estudos de Kadthur (2011) os carcinomas de células escamosas apresentaram marcação em 21,24% das células, sendo este o tipo histológico com maior índice de Ki-67 e também o mais maligno. Em termos percentuais as marcações obtidas para tumores deste tipo no nosso estudo e no de Kadthur (2011) não foram muito diferentes, mas no nosso estudo este foi o tipo histológico maligno com menor percentagem de marcação. Não sendo também expressivas as divergências de marcação entre os carcinomas, e verificando-se uma maior marcação dos carcinomas simples em relação aos complexos, julgamos que se os carcinomas de células escamosas tivessem uma maior representação na amostra (n=5) os nossos resultados poderiam ter encontrado uma maior paridade com os do autor supracitado. Tal como nos estudos de Peña et al. (1998), apesar da expressão deste marcador aumentar com a malignidade, não foi encontrada qualquer associação estatisticamente significativa entre o tipo histológico e o índice de Ki-67. Já em relação ao grau histológico de malignidade, foi encontrada uma associação

estatisticamente significativa ($p=0.028$), estando os tumores de índice proliferativo inferior a 25% associados ao grau I e os de índice superior aos graus II e III de malignidade. O grau de malignidade é, como vimos, estabelecido a partir de 3 parâmetros dentro dos quais consta a avaliação do índice mitótico (ou contagem mitótica), ele próprio uma ferramenta interessante de prognóstico no sentido de permitir também estimar o nível de proliferação celular de uma forma econômica e relativamente imediata. Tendo sido já verificada uma correlação positiva entre a contagem mitótica e o índice de Ki-67 (Dutra et al., 2008; Cassali et al., 2014), estes resultados vão, ainda que de uma forma algo indireta, de encontro ao já previamente publicado, onde o grau de malignidade I e o valor de índice proliferativo escolhido por Peña (25%) são os *cut-off* mais adequados para a avaliação estatística desta relação. Estranhamente, em termos quantitativos as médias de Ki-67 indicam uma maior proximidade de valores entre os graus I e II do que entre II e III, pelo que julgamos que a dispersão encontrada para cada uma das classes terá sido um fator importante no significado estatístico da associação.

Quando ocorreu infiltração linfocítica, apesar de nos tumores se verificarem índices ligeiramente superiores, ao contrário de nos estudos obtidos por Zuccari (2008) não foi encontrada uma associação com significado estatístico. A presença de necrose intratumoral surge também claramente associada a índices proliferativos mais elevados, existindo evidência estatística muito forte desta associação quando foram considerados os valores *cut-off* mais elevados (25% [$p=0.008$] e 20% [$p=0.004$]). Tendo já sido discutido o valor prognóstico da necrose intratumoral quando associada ao tamanho tumoral e respetivas interdependências, esta associação enquadra-se perfeita e coerentemente nos achados anteriores.

Considerado em muitos estudos um fator independente de prognóstico de *metastização*, de TS e de TLD (Misdorp et al., 1976; Peña et al., 1998; Nieto et al., 2000; Sarli et al., 2002; Zuccari et al., 2004; Ferreira et al., 2009), este marcador teve uma expressão exuberante em todos os tumores provenientes de animais nos quais ocorreu este processo (entre 35,72% e 45,44%). Para Peña, (1998), um valor *cut-off* de 24% definiu a percentagem acima da qual a probabilidade de desenvolvimento de metástases aumentou em 99%. Como havíamos referido, consideramos a recomendação de *cut-off* (25%) de Cassali (2014), obtida a partir dos estudos de Peña, para definir os tumores de índice proliferativo alto. Os 19 tumores considerados nesta categoria (Ki-67 >25%) pertencem a 14 animais, não havendo possibilidade de verificar da existência de metastização a nível dos linfonodos para 4 deles. Podemos concluir então que, considerando um limiar de 25% de marcação de Ki-67, a metastização foi detetada em 20% desses animais (2 de 10). No estudo de Peña (1998), o índice de Ki-67 variou entre 1 e 31% enquanto no nosso entre 1 e 66%, pelo que a distribuição de índices proliferativos foi notoriamente diferente, o que pode estar na base da disparidade de resultados. Para Santos et

al. (2013), por exemplo, a amplitude de valores distribuiu-se entre os 6,5% e os 84,2%, o que nos leva a considerar que não será uma falha técnica o que estará na base da disparidade, mas antes que as diferenças de dimensão e a heterogeneidade de amostras condicionem o estudo de conjuntos de tumores completamente diferentes e se chegue a caracterizações necessariamente diferentes dos grupos. Por último, uma outra possibilidade de justificação para a baixa deteção de metástases na totalidade destes prende-se com a disponibilidade de linfonodos para análise. Para efeitos de discussão, convém admitir a possibilidade de ter ocorrido metastização para linfonodos não analisados. Dos 8 casos nos quais não se verificou metastização, 4 deles tiveram localização nas glândulas torácicas e abdominais craniais. Como havíamos visto, os sítios preferenciais de drenagem destas glândulas incluem os linfonodos axilares propriamente ditos, os linfonodos axilares acessórios e os esternais. Em nenhum destes casos estes linfonodos foram recolhidos ou analisados. Dos restantes 4 tumores, 1 teve localização a nível das glândulas abdominais caudais, havendo a possibilidade de ter ocorrido metastização para os linfonodos ilíacos mediais. Partindo destas considerações existiria a possibilidade de ocorrer, acima do limiar definido por Peña, a metastização em 70% dos animais, que se aproxima bastante mais do valor de risco encontrado por esta. Propõe-se, para encontrar um limiar de proliferação que defina uma probabilidade significativa de ocorrência de metastização, um estudo baseado numa amostra consideravelmente maior e elaborado atendendo à heterogeneidade tumoral das cadelas, bem como a recolha de todos os linfonodos considerados relevantes para a avaliação do decorrer desse processo, ou a elaboração de um algoritmo que permita calcular o risco de metastização de acordo com o número de linfonodos analisados, dos possíveis.

Não deixa de ser evidente a relação que existe entre o índice proliferativo definido por Ki-67 e a metastização, verificando-se a existência de uma associação com significado estatístico entre estas duas variáveis utilizando qualquer um dos métodos de categorização daquele, corroborando os estudos publicados anteriormente citados (p sempre entre 0.001 e 0.002).

Verificamos também nos animais nos quais ocorreu metastização que uma análise “holística”, de todos os tumores presentes nesse animal, permite encontrar uma força de associação mais forte entre estas variáveis, comparativamente à análise restrita dos tumores selecionados para cada caso (nível de significância relevante apenas para divisão com *cut-off* 25%). Este facto poderá dever-se à probabilidade dos tumores escolhidos como representativos não terem sido os que, de facto, estiveram implicados no processo metastático. Resulta que se torna preferível incluir todos os tumores do animal, ainda que possivelmente em estadios precoces de desenvolvimento, a proceder ao estudo de apenas um.

Considerando as associações encontradas tanto com o tamanho tumoral como com a metastização, a associação do índice de Ki-67 com o maior estadio TNM (IV) atribuído

($p=0.052$) não é surpreendente. Dada a importância do estadiamento no fornecimento de informações sobre a malignidade da doença, a expectativa de sobrevivência e prognóstico em geral (Hellmén et al., 1993; Sobin et al., 1997; Peña et al., 1998; Ferreira et al., 2009; Sorenmo et al., 2013; Cassali et al., 2014) o Ki-67 surge como um indicador destas mesmas.

Entre as expressões de RP e Ki-67 não foram encontradas associações significativas, ao contrário do que seria expectável (Geraldés et al., 2000; Nieto et al., 2000; De las Mulas et al., 2005; Millanta et al., 2005; Mariotti et al., 2013; Cassali et al., 2014). Em cadelas, à semelhança do que foi descrito para as mulheres (Cassali, 2000), foi descrita uma correlação inversa entre estes marcadores, particularmente em tumores mais indiferenciados, estando a transformação celular na base da perda dos efeitos estimulantes das hormonas a nível das células tumorais (Rutteman et al., 1988) bem como a perda de recetores hormonais em si. A tendência de relação inversa de expressão encontrada foi muito ténue (para todos os valores *cut-off* de Ki-67 considerados). A ausência dos resultados com maior significado pode ser devida ao facto de, como mencionado por Peña (2014), não haver ainda um valor unânime para a divisão dos tumores em positivos ou negativos a este marcador, havendo evidentes variações nos estudos relativos a este tema. Pode também, em alguns casos, estar associada ao número de células na fase G0, negativa ao Ki-67. No entanto, é de salientar que em múltiplos estudos os autores (Perez-Alenza et al., 2000; Perez-Alenza et al., 2006) falharam em conseguir resultados com significado estatístico a nível desta associação. A recomendação de Peña et al. (2014) no sentido de privilegiar uma análise baseada nos *score Allred*, se frutífera em termos analíticos, impossibilita um estudo estatístico associativo por teste de Qui-quadrado ou correção de Fisher com amostras da amplitude da nossa.

VI 3.2 RP

A maior parte dos estudos existentes dedicados à avaliação da expressão dos recetores hormonais em tumores mamários considera uma dicotomização dos tecidos em positivos ou negativos, ainda que de acordo com critérios variáveis. Para o estudo deste marcador neste trabalho foi considerada, adicionalmente, a sugestão de Peña et al. (2014), para quem a inexistência de resultados experimentais respeitantes à definição de um limiar de positividade justifica a adoção (ou referência) dos valores de *score Allred*, em si, para uma melhor caracterização. Estes valores são então referidos mas, no sentido de facilitar uma análise estatística, a análise será em muito respeitante à supracitada dicotomização.

Pela impossibilidade de detecção de RE a análise incidirá, naturalmente, apenas na marcação de RP. Como havíamos verificado, a detecção de RP em tumores negativos a RE pode dever-se à ocorrência de falsos negativos para RE, à existência de níveis muito baixos de RE ou à existência de variantes de RE, capazes de estimular a expressão de RP não reconhecidas pelo anticorpo usado na técnica imunohistoquímica. A tentativa de marcação dos tecidos quanto à expressão de RE revelou-se num grande dispêndio de tempo e na mobilização de grandes esforços para o encontro de alternativas que permitissem contornar essa incapacidade. O facto de ter sido possível obter uma marcação satisfatória dos tecidos quanto aos RP, bem como dos restantes marcadores, descartou de alguma forma a possibilidade de essa ausência de marcação se dever a um tratamento ineficiente ou inadequado dos tecidos pré-técnica IHQ. Qualquer passo relativamente à técnica imunohistoquímica em si foi repetido e, de acordo com a documentação analisada, adaptado ou alterado, de forma a conseguir desmascarar qualquer inadequação específica. A possibilidade de o anticorpo usado estar alterado de forma a ter perdido as suas propriedades de marcação foi descartada pelo facto de permitir uma marcação satisfatória em tecidos de gata, sendo utilizado contemporaneamente e dentro das mesmas condições que nos de cadela. O envio das amostras para um instituto de referência e a realização da técnica por investigadores de experiência indubitável como último reduto de uma congregação de esforços que saíram, mais uma vez, gorados, revelou-se extremamente frustrante. Daqui resultou a aceitação da incapacidade de detecção do problema a contornar e a cessação de esforços no sentido de o encontrar. Considera-se então a existência de falsos negativos, uma vez que não se pode falar de uma total ausência de marcação dos tecidos mas de uma marcação de qualidade muito deficiente (ténue) para ser considerada, quer nos tecidos usados para controlo quer nos tecidos constituintes da amostra a analisar.

Sendo a maior parte dos estudos publicados relacionada com a expressão de recetores hormonais incidente na expressão de RE ou na expressão conjunta de RE e PR, o tipo de ilações possíveis a partir da expressão isolada de PR é algo diminuta, mas nem por isso isenta de interesse, se considerarmos que a maior parte dos tumores com sobre-expressão de RP apresentaria também sobre-expressão de RE (Thakkar et al., 2011). Como havíamos mencionado, alguns autores consideram que a existência de RP e RE ou apenas RE tende a condicionar melhor prognóstico que a existência de apenas RP ou a inexistência dos dois marcadores (Sartin et al., 1992), e a diminuição da relação entre RE e PR tem vindo a ser associada a uma maior progressão da doença e pior resultado clínico, quer em cadelas quer em mulheres. Em outros estudos (De las Mulas et al., 2005) evidenciou-se ser indiferente o tipo de marcador para a avaliação destes parâmetros. Para outros ainda, os tumores RP negativos apresentam, na generalidade, pior prognóstico que os RP positivos (Cork et al., 2008; Louis et

al., 2012). Ainda assim, de acordo com Payne et al. (2008), o valor preditivo de prognóstico da positividade de recetores de progesterona na ausência de dados sobre a expressão para recetores de estrogénio é controversa, resultando da sua avaliação, em vários estudos, conclusões antagónicas, pelo que o valor de RP como fator de prognóstico independente ainda é incerto. Ao considerarmos os estudos de sobrevivência relativamente a este marcador, não podemos avaliar de todo o nível de expressão de RE nos tumores que expressaram RP, assim como temos de assumir que existirão, muito provavelmente, tumores assumidamente negativos a RP e como tal negativos para os recetores hormonais, que seriam, de facto, positivos para RE, representando expectavelmente melhor prognóstico. Quanto ao TS, as cadelas representadas por tumores considerados positivos para os RP apresentaram, de facto, maior tempo, embora não grandemente assinalável, e de forma alguma significativo. Para o TLD não se pode sequer considerar haver uma diferença no tempo de recidiva. Dada a parca disponibilidade de dados, não é possível chegar a quaisquer conclusões utilizando, alternativamente, os *score Allred*. As cadelas inteiras apresentaram significativamente mais tumores positivos a RP, o que vai de encontro aos resultados de Louis et al. (2012). Sendo que em vários estudos (De las Mulas et al., 2005) a caracterização dos tumores em termos de recetores moleculares define como mais prevalente a expressão simultânea dos dois marcadores, poder-se-á esperar alguma semelhança quanto à imunodeteção. As cadelas ovariectomizadas deixaram de ser submetidas mais precocemente à ação destas hormonas, verificando-se também por isso uma diminuição dos recetores, mesmo no tecido mamário normal. O facto de as cadelas de raça indeterminada apresentarem também tumores com estas características estará relacionado com o facto de estas estarem significativamente associadas a este estatuto reprodutivo (inteiras). Estes achados demonstram a influência multifatorial no crescimento dos tumores de mau prognóstico (Mariotti et al., 2013), já que se verificou consistentemente a existência de menores expressões de recetores hormonais em cadelas ovariectomizadas, mesmo em idades que representam menor risco de aparecimento de patologia mamária. Os tumores positivos a RP foram predominantes nas cadelas mais novas, como expectável, embora não significativamente. O tecido mamário normal e alterações mamárias benignas apresentaram *scores Allred* muito elevados, que os categorizam como positivos a PR, o que vai de encontro ao documentado. O tecido mamário normal apresentou um *score* próximo do máximo e as alterações benignas (adenoma e ectasias mamárias) um *score* elevado (5). Sendo diminuta a amostra relativa a estes casos, estes resultados não nos permitem fazer generalizações. No entanto, vão de encontro ao documentado em vários estudos (Rutteman et al., 1998; Sleck et al., 2011; Mariotti et al., 2013) e ao entendimento de que estas hormonas têm um efeito essencialmente importante no início da carcinogénese (mais a nível da promoção que da iniciação) e vão perdendo progressivamente

o seu efeito estimulatório à medida que se avança na doença e se progride para uma autonomia tumoral. Neste sentido, para muitos autores as metástases deverão, na generalidade, ser negativas para estes recetores (Sartin et al., 1992; Donnay et al., 1995; Nieto et al., 2000; Amorim et al., 2008). De facto, no nosso estudo, os dois tecidos analisados correspondentes a metástases apresentaram marcação absolutamente negativa (*score* 0) e no limiar da positividade (*score* 3). Nos resultados de Mariotti (2013), a percentagem de deteção de RP em linfonodos metastáticos foi de 12%, correspondendo a dois de 16 analisados. A nossa percentagem de 50% não deve ser valorizada face à reduzida amostragem.

Quanto ao universo dos carcinomas mamários, obtivemos 85% tumores positivos a RP, distribuídos pelos *score* 3 a 8. A dicotomização de tumores mamários malignos em positivos e negativos relativamente a este marcador resulta em caracterizações muito diferentes nos vários estudos, a que não estará isento o facto de terem sido consideradas várias formas de proceder a esta categorização. Se para alguns autores (MacEwen et al., 1982; Rutteman et al., 1988; Donnay et al., 1995; Millanta et al., 2005) existem ambos os tipos de recetores em 70% dos tumores, com a percentagem de cadelas que apresenta apenas um dos tipos inferior a 20%, outros (De las Mulas 2005) consideram a percentagem de tumores positivos a estes recetores entre os 8 e os 22%. Também em relação à marcação de RE a disparidade compreende valores entre os 10% (Geraldés et al., 2000) e 87,5% (Nieto et al., 2000), o que nos leva a ter em linha de conta o facto de haver grandes diferenças nas metodologias e critérios de classificação adotados para qualquer dos marcadores moleculares considerados. Num estudo recente (Mariotti et al., 2013) a marcação de RP foi observada em 96% dos carcinomas mamários caninos.

Por outro lado verificámos um decréscimo da expressão de RP à medida que avançamos para tipos histológicos considerados mais malignos (Misdorp et al., 2002), considerando carcinomas complexos, simples, anaplásicos, de células escamosas e carcinosarcoma. Sendo 3 o nosso limiar de positividade, a média de valor do *score* para cada um dos tipos histológicos foi positiva. Já para Millanta (2005) uma grande percentagem de carcinomas invasivos se havia revelado positiva a este marcador e De las Mulas (2005), não conseguindo encontrar diferenças significativas entre os diferentes tipos histológicos de tumores, verificou maior expressão em carcinomas simples e complexos que em tipos mais indiferenciados. No nosso estudo, a tendência de menor apresentação de expressão de RP nos carcinomas simples que nos complexos não é significativa ($p=0.179$). Contudo, considerando a divisão de carcinomas em simples e complexos versus carcinomas de tipo especial (carcinoma de células escamosas), a perda de expressão RP nestes torna-se muito evidente e significativa do ponto de vista estatístico, o que vai de encontro à perceção da sua maior malignidade e indiferenciação ($p=0.021$). Julgamos que com uma maior amostra, e dada a tendência verificada em relação

também ao carcinoma simples anaplásico e carcinosarcoma, poderíamos ter chegado a resultados mais significativos para a valorização destas conclusões. A imunomarcação negativa para RP foi significativamente associada ao grau III de malignidade ($p=0.038$). Esta associação justifica-se pelo facto de nos tumores malignos, de uma forma geral, a expressão dos genes que codificam para os recetores hormonais estar diminuída, particularmente nas neoplasias de maior grau de malignidade ou em fases mais avançadas da doença.

Quanto ao tamanho tumoral não se conseguiu encontrar interdependência significativa entre variáveis considerando qualquer das categorizações. Em estudos anteriores os resultados são variáveis e diferem nas conclusões. Se para alguns investigadores a presença de RP se encontra significativamente reduzida em tumores de grandes dimensões e malignos constituindo-se, pela forma como se associa a outras variáveis, um fator de bom prognóstico, outros investigadores (Mariotti et al., 2013) não conseguem encontrar resultados significativos que permitam esta associação. O mesmo se verificou considerando a multiplicidade de tumores, a bilateralidade da sua incidência, a necrose, a infiltração celular linfocítica e a invasão metastática, bem como a expressão dos restantes marcadores.

A intensidade da marcação revelou-se bastante heterogénea na maior parte dos tumores, verificando-se a existência de zonas fortemente positivas, quer em termos de intensidade de coloração quer em termos percentuais de células marcadas, adjacentes a zonas francamente negativas, o que terá como causa uma atividade celular diferenciada em função da zona (Snead et al., 1993). Para o nosso estudo de associações entre variáveis foi necessário dicotomizá-las sendo, no caso da avaliação da expressão de RP adotado o sistema utilizado para a mulher para dividir os tumores em positivos e negativos. Peña (2014) justifica a importância de utilizar, sempre que possível, os valores de *score* em si em detrimento de uma classificação dicotómica pelo facto de não ser ainda consensual esse limiar de positividade na cadela. Julgamos que a necessidade de utilizar um limiar não definido para esta espécie possa de alguma forma influir na exatidão dos resultados obtidos.

VI 3.3 HER-2

Vários estudos demonstram uma correlação, na mulher, da sobre-expressão de HER-2 com menores TS e DFS e um pior prognóstico. (Perou et al., 2000; Sorlie et al., 2001; Cassali et al., 2014). No nosso estudo, os animais representados por tumores positivos a HER-2 (*score* 3+) apresentaram menor TS e TLD que os representados por tumores negativos a HER-2 (*score* 0, 1+ e 2+). As diferenças de tempos, não sendo significativas a nível estatístico para qualquer das

variáveis, foram mais expressivas quanto ao tempo de sobrevivência (5 meses) que quanto ao tempo livre de doença (2 meses). Estes resultados apontam de alguma forma para que a sobre-expressão de HER-2 seja um fator de prognóstico negativo. As cadelas com tumores HER-2 positivos apresentaram uma média de TS e TLD muito semelhantes (13 meses), mas muito longos quanto ao descrito por outros autores (De las Mulas et al., 2003) que obtiveram para estes períodos tempos inferiores a 6 meses. Existem, no entanto, vários estudos (Gama et al., 2008a; Hsu et al., 2009) a refutar estas conclusões, ora apresentando resultados que trazem indicações sobre este ser afinal um marcador de prognóstico positivo (pelo facto da sua sobre-expressão representar maiores TS e DFS), ora não sendo possível encontrar qualquer correlação entre a sobre-expressão e tempos de sobrevivência, com as cadelas a apresentar os mesmos TS independentemente de apresentarem sobre-expressão ou não (Dutra et al., 2004; Ressel et al., 2013). Como os próprios autores assinalam, a ausência de sistematização a nível de técnica imunohistoquímica, de anticorpos utilizados e do critério que define a sobre-expressão pode estar na base destas disparidades. Para todos os estudos mencionados, os tecidos classificados como apresentando sobre-expressão, ou seja, HER-2 positivos, foram os que apresentaram um *score* de 2 ou 3, constituindo uma diferença assinalável quanto ao nosso critério, sugerido por Peña (2014) com o objetivo de colmatar a ausência de uniformização nos estudos (apenas *score* 3). Assim, a comparação com resultados obtidos por estudos anteriores deverão ter este facto em consideração. Assinalável é também a diferença em termos de tamanhos amostrais. De las Mulas (2003), por exemplo, baseou as suas conclusões num estudo que incidiu sobre 17 carcinomas, 3 deles positivos ao marcador. No seu estudo foram estabelecidas relações com outros indicadores de mau prognóstico, como maior tamanho tumoral, crescimento do tipo invasivo, grau histológico III e ausência de marcação para recetores hormonais, por análise aos 3 tumores. Na realidade, uma outra dificuldade em definir o valor prognóstico deste marcador reside na paucidade do estabelecimento de relações significativas com outros indicadores de prognóstico. Ressel (2013), por exemplo, falhou em encontrar significado estatístico nas associações deste marcador com o tipo histológico tumoral (simples/complexo), o grau histológico, a infiltração linfocítica e a idade das cadelas. Conseguiu, no entanto, relacioná-lo com o índice mitótico (encontrando uma correlação positiva). Kim (2010) também não conseguiu encontrar correlações da sobre-expressão proteica com a idade, o tipo histológico, a invasão linfática, a infiltração linfocítica, o grau histológico ou a existência de necrose. Por outro lado, vários autores conseguiram encontrar relações significativas com outros indicadores de mau prognóstico, nomeadamente o diagnóstico histopatológico de malignidade (Ahern et al., 1996), maior grau histológico (De las Mulas et al., 2003; Dutra et al., 2004), maior tamanho tumoral (De las Mulas et al., 2003), a contagem mitótica e pleomorfismo molecular (Dutra et

al., 2004), maior índice proliferativo por Ki-67 (Rutteman et al., 1990), a ausência de recetores hormonais esteroides (De las Mulas et al., 2003), etc.

Em suma, a literatura sobre o valor prognóstico deste marcador continua a apresentar conclusões baseadas em resultados contraditórios. Na nossa amostra a percentagem de carcinomas mamários malignos HER-2 positivos encontrada (19,40%) pode-se considerar dentro dos valores normais, já que os dados de estudos anteriores apontam para uma amplitude de valores muito vasta e, como vimos, existem diferenças no critério de classificação. Juntando a estes os tumores com um *score* 2+, a percentagem estaria nos 38,80%, valor bastante semelhante ao encontrado em vários outros estudos: 35,3% para Kim et al. (2010), 49% para Sassi (2010), 28% para Im (2014), 21% para Gama (2008). Considerando apenas os tumores representativos de cada animal, o valor encontrado não difere muito do que foi encontrado quando se considera a totalidade dos tumores malignos (18,92%). A sobre-expressão no adenoma mamário não surge como surpreendente, havendo igualmente vários estudos a suportar maiores (50% nos estudos de Rungsipipat et al., [1999] e 27,3% nos de Ressel et al., [2013]) ou menores (0% nos estudos de Hsu et al. [2009]) expressões deste marcador em tumores benignos, o que estará relacionado com o papel desta proteína na regulação de funções celulares fundamentais para o normal desenvolvimento biológico como a angiogénese, o crescimento, a proliferação, a diferenciação, a resposta imunitária, a mobilidade, a adesão, a sobrevivência e a apoptose celulares (Santos et al., 2012; Roskoski et al., 2014). A este propósito e com os resultados obtidos, Rungsipipat (1998) havia afirmado que, sendo sugerido o papel na proliferação dos tecidos mamários em cadelas, os resultados apontavam para o facto de o HER-2 não estar envolvido na transformação maligna nem poder ser associado a um menor tempo de sobrevivência. Em 2009, Hsu, a propósito de encontrar maiores tempos de sobrevivência para cães positivos a HER-2, afirma igualmente a possibilidade de o HER-2 desempenhar um papel na iniciação tumoral mamária canina, mas a sua sobre-expressão não estar necessariamente associada, de forma direta, ao desenvolvimento do tumor. No nosso caso, para nenhuma das variáveis analisadas se encontrou uma relação de dependência da sobre-expressão com significado estatístico. Verificou-se, no entanto, a tendência para esta se relacionar com tumores de índice proliferativo de Ki-67 mais baixo, para qualquer dos *cut-off*. Estes resultados vão contra o documentado por vários autores (Dutra et al., 2004; Gama et al., 2008a) e, de alguma forma, contra a tendência de sobrevivência que se havia verificado, já que um índice elevado de Ki-67 surgiu no nosso estudo como tendencialmente indicador de mau prognóstico. Permanece incerto o valor prognóstico deste marcador quando analisado isoladamente.

VI 3.4 CK 5/6

Partindo de uma análise isolada aos resultados relativos à imunomarcação das CK5/6, o nosso estudo permitiu chegar a tempos muito similares quer de TS quer de TLD, verificando-se, sem significado estatístico, tempos de sobrevivência ligeiramente maiores para os tumores positivos a este marcador que para os negativos. Este resultado não é suportado de forma alguma pela literatura, quer em humanos (Dairkee et al., 1987; Van de Rijn et al., 2002; Sotiriou et al., 2003; Abd El-Rehim et al., 2004), quer em cães (Hellmén et al., 1989; Griffey et al., 1993; Ramalho et al., 2006). De facto, em vários estudos a expressão de CK5/6 tem vindo a ser considerada um fator *independente* de mau prognóstico (Van de Rijn et al., 2002; Abd El-Rehim et al., 2004), apontando para um TS curto e um breve TLD. No nosso estudo estes resultados estarão relacionados com o facto de 97% dos carcinomas analisados terem apresentado imunoreatividade, restando uma amostra muito diminuta de tumores negativos às citoqueratinas. Nesses, os dois tumores considerados do tipo histológico mais maligno (o osteossarcoma e o carcinossarcoma), apresentaram imunoreatividade negativa, constituindo 50% da amostra total de carcinomas negativos a essa marcação. De acordo com o descrito na literatura, os restantes tumores negativos apresentaram-se associados a características de menor malignidade, ou normalmente associadas a bom prognóstico, como pequenas dimensões (Van de Rijn et al., 2002), tipo histológico simples (Sassi et al., 2010), e grau histológico de malignidade I (Malzahn et al., 1998; Van de Rijn et al., 2002; Eerola et al., 2008). Apenas um destes tumores apresentava necrose tumoral e nos dois a diferenciação mesenquimatosa estava ausente. Considerando o universo de carcinomas positivos às citoqueratinas, a diversidade de características é enorme, razão pela qual, possivelmente, não se terá chegado a mais conclusões significativas, apesar das tendências verificadas no sentido de se associar essa expressão à existência de necrose intratumoral, ou aos carcinomas de tipo histopatológico complexo. Os únicos resultados significativos encontrados foram relativamente à relação com o índice de Ki-67, verificando-se que os tumores imunoreativos às citoqueratinas apresentavam, tanto para o *cut-off* de 25% como para o *cut-off* de 20%, menores índices proliferativos. Estes resultados vão também no sentido oposto ao descrito na literatura relativa à espécie humana (Korsching et al., 2002) e à espécie canina (Gama et al., 2008b) mas julgamos que estes resultados deverão ser considerados com reserva, considerando a discrepância de características do tamanho amostral de tumores com imunoreatividades positiva e negativa para CK5/6.

Tanto o tecido normal como as ectasias ductais e o adenoma mamário apresentaram marcação positiva para este marcador. No tecido mamário normal da mulher, as CK5/6 são expressas, em quantidades variáveis, pelas células mioepiteliais e pelas células basais (Otterbach et al., 2000).

Boecker (2002) e colegas haviam descrito a população de células que expressa estas CK5/6 como representantes de células tronco ou progenitoras, que poderiam originar tanto células luminais como mioepiteliais perfeitamente diferenciadas. Estas citoqueratinas passaram também a ser consideradas particularmente valiosas no estabelecimento de um diagnóstico diferencial entre lesões proliferativas benignas e atípicas ou malignas. Vários estudos (Otterbach et al., 2000, Clarke et al., 2004; Pathmanathan et al., 2010) permitiram verificar que a imunomarcagem para CK5/6 pode ser preditiva de benignidade em lesões proliferativas (ou papilares), havendo uma perda de imunoreatividade com o aumento da atipia (ou um desenvolvimento das lesões benignas para pré-malignas) ou malignidade (no caso descrito por Pathmanathan [2010], definida pela completa ausência da camada mioepitelial ou um crescimento sólido atípico e uniforme com ausência parcial da camada celular mioepitelial). A sobre-expressão volta a verificar-se num subgrupo tumoral com características muito específicas, integrada no subtipo molecular Basal quando perante a simultânea imunonegatividade para RP, RE e HER-2, mas aqui existem já diferenças substanciais a ter em conta (nomeadamente as morfológicas) suficientemente distintivas da malignidade *per se*. Em humanos, a sobre-expressão única de CK5/6, para além de permitir definir um subtipo de carcinoma ductal (o Basal) de pior prognóstico com o perfil de marcação supracitado (Livasy et al., 2007), permite também distinguir a hiperplasia ductal da mama de carcinomas sólidos ductais *in situ*, para os quais não se verifica marcação (Bane, 2013). Nos estudos de Ding & Ruan (2006), a taxa de marcação para lesões mamárias benignas foi de 100%, houve marcação para algumas células ductais em hiperplasias ductais, não houve marcação em carcinomas ductais *in situ* e, em carcinomas ductais invasivos, quase não se detectou CK5/6. Assim, no que diz respeito à marcação por CK5/6, os tecidos ou alterações destes devem ser analisados de uma perspetiva multifatorial integrada, já que tanto podem corresponder a benignidade como a uma maior malignidade.

Ainda sobre o tipo histológico, de acordo com vários autores (Gama et al., 2003; Ramalho et al., 2006; Sassi et al., 2010), apesar de ainda assunto de debate, em Medicina Veterinária os componentes mesenquimais dos carcinomas complexos e padrões mistos de tumores mamários têm como origem mais provável as células mioepiteliais, razão pela qual a marcação de CK5/6 neste tipo de tumores é expectável, tanto nas células progenitoras bipotenciais como nas basalóides.

O tipo histológico em que se verificou uma marcação mais expressiva foi nos carcinomas de células escamosas, superior à encontrada nas células glandulares, à semelhança de estudos anteriores (Sassi et al., 2008) para a espécie canina e de acordo com o facto de, para patologistas de Medicina humana, este ser um marcador de referência para a marcação positiva de epitélios

escamosos (células basais) de vários tecidos. Comparando com estudos de outros autores que procederam igualmente ao estudo imunohistoquímico de carcinomas mamários caninos utilizando, nomeadamente, marcadores para a deteção da expressão de citoqueratinas, verificamos que a nossa percentagem de 97,01% de positividade é elevada. Para Gama (2008a), a percentagem de carcinomas positivos foi de 32,4%, para Sassi (2010) a percentagem foi de 10% e no estudo ORPHEO (2014) a percentagem foi de 65%.

No estudo de Ramalho (2006) houve marcação de CK5 em 100% dos carcinomas em tumores benignos mistos, bem como nos carcinomas escamosos (marcação superior a 50% de células). No nosso estudo, dos 67 carcinomas para os quais se avaliou a marcação temos que os carcinomas complexos e escamosos, em relação aos quais faz sentido considerar positividade, totalizam 73,1% (49 carcinomas). Se a estes adicionarmos os carcinomas simples com diferenciação mesenquimatosa, esta percentagem passa a 80,6%, o que já não constitui uma tão grande discrepância em relação aos nossos resultados.

Na avaliação da percentagem de células com citoplasma marcado por este marcador, pretendeu-se considerar apenas as células neoplásicas. Contudo, esta avaliação nem sempre esteve isenta de erro, nomeadamente pelo facto de o tecido normal ser possivelmente imunoreativo e de o *cut-off* que define a positividade ser correspondente a uma percentagem baixa de células. Consideramos assim que este marcador se prova de maior valor quando, de facto, integrado com o conjunto da expressão de outros marcadores, nomeadamente no contexto da classificação molecular.

VI 4. Caracterização tumoral e estudo de prognóstico de acordo com classificação molecular

O estudo de sobrevivência para a avaliação do valor de prognóstico de subtipos moleculares de TMC resultou em maiores TS para os animais representados por tumores do subtipo Luminal A (19,375 meses), seguidos do Luminal B (19,111 meses), do Basal (15,800 meses) e do HER-2 positivo (13,250 meses). Entre os subtipos Luminal A e B a diferença de TS é mínima, sendo que para o TLD existe uma inversão relativamente a estes subtipos (15,250 meses para Luminal A e 15,875 para Luminal B)., Também aqui a diferença é praticamente inexistente. A tendência de menores TLD para os restantes subtipos manteve-se, sendo o Basal (15,402 meses) determinante de um tempo ligeiramente superior ao de HER-2 positivo (13,250 meses). Estes resultados, não refletindo diferenças estatisticamente significativas, permitem inferir de uma tendência que vai ao encontro daquilo que está estabelecido para a mulher (Perou et al., 2000;

Sorlie et al., 2001; Nielsen et al., 2004; Carey et al., 2006; Cheang et al., 2009; Pusztai et al., 2009; Reis-Filho et al., 2010). Já em relação aos estudos na cadela que encontram, entre si, um grau de divergência substancial, não se consegue encontrar o mesmo paralelismo. Gama (2008a) havia encontrado, à semelhança deste trabalho, um mau prognóstico para os tumores do subtipo Basal, mas o melhor prognóstico foi encontrado para os tumores do tipo HER-2 positivo. Isto, contraintuitivamente às restantes associações feitas com este subtipo de tumor, caracterizado por maior dimensão tumoral, índice de proliferação elevado e a partilha com o subtipo Basal de outras características indicadoras de pior prognóstico, nomeadamente a associação a tipos histológicos mais agressivos de elevado grau. Já para Sassi (2010), apesar de também sem significado estatístico, o subtipo que apresentou melhor prognóstico foi o Basal, sendo superior aos subtipos Luminais, dentro dos quais o subtipo Luminal A apresentou um ligeiro melhor prognóstico. Neste estudo não foram identificados tumores do subtipo HER-2 positivo, à semelhança do que aconteceu nos estudos de ORPHEO (2014). Um outro estudo citado foi o de Im (2014) que, tal como neste trabalho e no de Gama (2008), conseguiu identificar os 4 subtipos tumorais. Tanto nos estudos de Im (2014) como no de ORPHEO (2014) o subtipo Basal surgiu associado a um pior prognóstico e o subtipo Luminal A a um melhor prognóstico, tendo sido mesmo diferenciado como fator independente de prognóstico favorável no estudo ORPHEO (2014).

Uma grande dificuldade que existe na comparação dos resultados destes estudos é, precisamente, a ausência de uniformização de técnicas, metodologias, escolha de painel de marcadores, critérios de avaliação de expressão de marcadores e critérios de classificação de tumores.

No nosso estudo obtivemos algumas associações com significado estatístico considerando o subtipo molecular tumoral. Utilizando apenas os tumores escolhidos como representativos de cada caso, a pureza da raça foi associada a uma maior ocorrência de tumores dos subtipos HER-2 positivo e Basal por oposição aos Luminais, verificando-se uma estreiteza de relação ainda maior quando considerados apenas os tumores do tipo Luminal B e a sua associação a cadelas de raça indeterminada. Havendo estudos destinados a verificar a predisposição rácica para a ocorrência de patologia mamária neoplásica em geral, não há, no conhecimento dos autores, estudos que se tenham debruçado sobre a prevalência específica de subtipos tumorais de acordo com a pureza de raça nas cadelas. Havendo evidências de predisposição de ocorrência de determinados subtipos moleculares em diferentes etnias de mulheres (Carey et al., 2006; Turner & Reis-Filho, 2006; Amirikia, Mills, Bush & Newman, 2011; Carey et al., 2013; Tao et al., 2015), não é de descartar a possibilidade de existirem estas associações também na espécie em estudo.

Apesar de sem significado estatístico, a proximidade do valor de prova leva-nos a considerar a tendência verificada para as cadelas previamente esterilizadas serem representadas por tumores de subtipo Basal em detrimento dos restantes ($p=0.052$). Sendo conhecido o valor da ovariectomia na prevenção do aparecimento de tumores mamários, foi já também discutido o facto de nenhuma das cadelas ter sido esterilizada numa altura comprovadamente determinante para esse aparecimento. Por outro lado, o facto de terem sido esterilizadas antes do aparecimento de um subtipo tumoral que se define pela inexpressão de recetores hormonais aponta para um aparecimento ou desenvolvimento diferenciado deste subtipo, menos relacionado com a repetição de exposição hormonal. Finalmente verificou-se a tendência para os tumores do subtipo Luminal B existirem frequentemente como tumores únicos ($p=0.058$) por oposição aos restantes subtipos tumorais, relacionados com a apresentação simultânea de vários tumores, resultado não encontrado em nenhum estudo anterior e que motiva de alguma forma o aprofundamento no conhecimento desse facto, já que se verificou nos tumores deste subtipo a associação a elevados índices de Ki-67.

Passando à análise de todos os tumores temos a considerar, na relação de cada um dos subtipos com cada um dos marcadores moleculares estudados, o facto de essa marcação ter sido, precisamente, determinante na definição de cada subtipo. Nesse sentido, o subtipo HER-2 positivo estará naturalmente relacionado com a expressão individual deste marcador e todos os outros associados à sua ausência (uma vez que a existência de positividade para o marcador determina, isoladamente, a sua inserção no grupo), os Luminais com a expressão dos RP, os Luminais B com a expressão elevada de Ki-67 e os Basais com a expressão de CK5/6. Fora destas associações, temos a associação do subtipo molecular HER-2 positivo com menores índices proliferativos de Ki-67, considerando a mediana como *cut-off*, e perdendo-se o significado estatístico utilizando *cut-off* superiores. Este resultado foi já discutido no âmbito da avaliação do valor prognóstico da expressão deste marcador, isoladamente, em relação ao qual se verificou a mesma tendência. Apontando os resultados dos estudos de sobrevivência para este se afirmar como o subtipo molecular mais maligno e havendo sido o Ki-67 considerado tendencialmente um indicador de mau prognóstico, a malignidade atribuída a este subtipo molecular não se parece relacionar com as características proliferativas deste tipo de tumor, estando provavelmente relacionada com outras características condicionantes de malignidade. Já o subtipo Luminal B, naturalmente associado a elevados índices de Ki-67, revelou uma associação significativa com a ocorrência de metastização regional ($p=0.010$) e uma *tendência* de associação com a existência de necrose tumoral (0.084), estando então associado a dois fatores comumente associados a um pior prognóstico, não se refletindo estes resultados, no entanto, em termos de tempo de sobrevivência ou tempo livre de doença. Os resultados destes

estudos de sobrevivência devem ser analisados à luz do facto de, havendo diferenças nos tempos estudados, estas não serem estatisticamente significativas. Finalmente, o subtipo Basal foi associado a carcinomas de células escamosas, como expectável, pelo facto de este tipo histopatológico apresentar uma imunomarcção muito intensa para as citoqueratinas basais e esta ser, precisamente, a característica que define este subtipo tumoral em termos moleculares. No geral, a classificação molecular neste estudo não permitia chegar a resultados considerados satisfatórios para uma óptima caracterização de cada um dos subtipos, nomeadamente pelo facto de terem sido encontradas poucas associações significativas ou mesmo poucos resultados com um valor de prova que nos permitisse avaliar tendências de associações. Julgamos que para este facto concorreu a impossibilidade de avaliar os tumores quanto à imunoexpressão de RE, existindo a franca possibilidade de os tumores Luminais e Basais não terem sido corretamente classificados. Ainda assim, os resultados encontrados não vão grandemente contra os previamente descritos para a mulher, nomeadamente em termos de tendência de tempos de sobrevivência à doença. Já em relação aos estudos existentes sobre a espécie canina, os resultados para estes são de tal forma divergentes que não se pode exatamente dizer que os nossos vão ou não de encontro ao conhecimento atual. É imperativo proceder a estudos em maior escala e definir critérios rigorosos de avaliação de marcadores e definição de subtipos moleculares, para que se parta de uma uniformidade de metodologias que permita estudos comparativos, no sentido de encontrar novos caminhos de investigação, cada vez melhor adaptados ao objeto e aos objetivos de estudo.

Capítulo VII – Conclusões

Este estudo permitiu-nos validar alguns fatores de prognóstico, não apenas por estudos de sobrevivência (TS e TLD) mas pela forma como esses fatores, ou variáveis, se relacionaram com outros de valor prognóstico conhecido. Na inexistência de valores de $p < 0.05$ mas aproximados, uma análise de tendências em termos de associações de variáveis pode ser em si uma mais-valia para chegar a conclusões importantes ou abrir novos caminhos de discussão. O mesmo se aplica às análises de TS e TLD em termos de diferenciais de tempos concretos. Verificou-se neste estudo que as conclusões obtidas a partir de uma análise univariada terão sempre de ser avaliadas sobre a perspectiva de uma possível influência “oculta” de outros fatores relacionados com as variáveis em questão, pelo que o seu valor independente terá sempre de ser confirmado por uma análise multivariada. Em termos concretos de resultados, a nossa amostra caracterizou-se por um número de cadelas com apresentação de patologia maligna em muito superior às de patologia exclusivamente benigna, com a idade média de ocorrência de tumor mamário, perfil rábico, ocorrência de multiplicidade e bilateralidade de tumores, seus tamanhos, localização, frequência de necrose intratumoral, infiltração linfocítica, diferenciação mesenquimatosa e tipo histológico de acordo com o documentado e descrito em revisão bibliográfica. As cadelas de raça pura foram significativamente mais submetidas a esterilização que as de raça indeterminada, sendo os seus tumores tendencialmente detetados quando estas são mais jovens e os tumores são de menores dimensões. A metastização nos linfonodos foi associada muito significativamente ao estadio TNM IV verificando-se já uma tendência muito forte ($p=0.052$) de associação com um estadio superior a II, o que nos leva a considerar o valor prognóstico do estadiamento e tamanho (reflectindo-se também em termos de TS). A sobrevivência dos animais sem metástases foi também marcadamente superior à daqueles onde se detetou metastização regional. O tamanho foi definido significativamente como um fator de prognóstico tanto para o TS como para TLD com o *cut-off* de 3cm como o valor a considerar. Foi também significativamente associado com a existência de necrose intratumoral (independentemente do *cut-off*) e com a infiltração celular linfocítica (com *cut-off* de 3 cm). Para a infiltração linfocítica a associação com o TS e o TLD é bastante expressiva, muito perto do nível de significância, podendo-se validar como de valor prognóstico. Esta variável foi também associada aos tipos histológicos mais malignos, com significância quando considerados apenas os epiteliais (associando-se significativamente aos carcinomas de células escamosas). Os estudos de sobrevivência não trouxeram qualquer informação relevante concernente à necrose intratumoral, prevendo-se que o seu valor prognóstico negativo esteja indissociavelmente associado ao tamanho do tumor. Verificou-se uma tendência para os

tumores de classificação histopatológica considerada mais maligna apresentarem maior tamanho à altura do diagnóstico. O grau III de malignidade foi associado significativamente aos tipos histológicos mais malignos, à necrose tumoral e à ausência de diferenciação mesenquimatosa, verificando-se igualmente tendência para ocorrência de infiltração linfocítica. A ausência de necrose tumoral foi também associada significativamente ao grau I de malignidade sendo a sua presença associada significativamente a graus superiores, independentemente da dicotomização escolhida. Também a tendência para a metastização ocorrer a partir dos tumores de maior grau (II e III) foi possível de averiguar.

Por análise de análise de TS e TLD, temos o tamanho (*cut-off* de 3 cm) como indubitável fator de prognóstico, seguindo-se como tendências muito quase estatisticamente significativas para o TS a infiltração linfocítica. A nível menos significativo temos a metastização regional, o estadiamento TNM dicotomizado em I+II/ III+IV e a classificação histopatológica se dicotomizada em carcinomas simples/complexos. Para o TLD temos como fatores muito valorizáveis o tamanho, a infiltração linfocítica e a OVH simultânea à mastectomia. Considerando os marcadores moleculares isoladamente, aquele que mostrou um valor prognóstico mais assinalável foi claramente o Ki-67, quer por estudos de TS e TLD (*cut-off* de 25%) quer associativos. Os maiores índices de Ki-67 foram associados de forma significativa aos tumores de maior tamanho (independentemente do *cut-off*), à ocorrência de necrose, aos graus de malignidade II e III, à ocorrência de metastização, à negatividade para CK5/6 e aos tumores pertencentes a cadelas de raça indeterminada. Foi encontrada uma tendência muito forte ($p=0.052$) de associação com maior estadio TNM (IV). Os maiores valores *cut-off* considerados, ou seja, 20% e 25% mostraram-se mais “adequados” na obtenção destas “interdependências”, em geral, que o valor de mediana. Não foram encontradas relações relevantes com o *status* reprodutivo dos animais, a infiltração linfocítica ou a diferenciação mesenquimatosa bem como com o tipo histológico, embora em geral se tenha verificado, por análise descritiva, um aumento da expressão deste marcador dos tecidos considerados mais benignos para os mais malignos. Concluimos que para uma melhor comparação de tipos histológicos em relação a qualquer marcador a amostra deverá quantitativamente mais equitativa em termos de tipo histológico.

Para os recetores de progesterona, verificando-se um TS ligeiramente superior para os tumores considerados positivos, o valor estatístico de prova não nos permite encarar este resultado como valorizável. De forma estatisticamente significativa, a sua menor expressão foi encontrada nas cadelas esterilizadas, de raça pura, nos carcinomas de células escamosas (em detrimento dos complexos ou simples) e em carcinomas de grau III de malignidade. Tendencialmente, os carcinomas simples apresentaram menor expressão de RP que os carcinomas complexos. A

sobre-expressão do HER-2 refletiu-se numa diferença assinalável no TS (5 meses), embora sem significado estatístico. Isoladamente, este marcador não provou o seu valor prognóstico, o mesmo acontecendo com as CK5/6, para as quais não se evidenciaram diferenças significativas em termos de TS ou TLD. Entre um e outro marcador existiram, contudo, diferenças em relação à comparação dos valores de expressão obtidos neste trabalho e em outros previamente documentados: para as CK5/6 existe uma disparidade assinalável em relação à generalidade dos resultados. Em termos associativos, a maior expressão de CK5/6 relacionou-se de forma estatisticamente significativa com maiores índices de Ki-67 e, em termos tendenciais, com a necrose tumoral e os carcinomas complexos (por oposição aos simples).

Verificou-se a inexistência de conservação de características imunofenotípicas dos tumores primários considerados representativos para as metástases estudadas. Considerando-se a pequena amostra de tecidos tumorais metastáticos verificou-se uma expressão de RP muito reduzida e que a inversão da expressão das CK5/6 e HER-2 é possível tanto quanto a sua manutenção, não existindo conservação da classificação molecular ou dos índices proliferativos de Ki-67 (também estes menos expressivos nas metástases).

Os TS foram superiores para os subtipos Luminais (Luminal A superior e Luminal B), seguindo-se o subtipo Basal e com o subtipo HER-2 positivo a representar o subtipo de pior prognóstico. Em termos de TLD, parece haver uma tendência para o subtipo HER-2 positivo ser o primeiro a recidivar, seguindo-se o Basal e os Luminais (com inversão dos subtipos, neste caso). Estes resultados não apresentaram significância estatística. Os subtipos Basal e HER-2 positivo foram, em conjunto, associados à pureza da raça. O subtipo Basal foi associado aos carcinomas de células escamosas, à ausência de positividade para RP e verificou-se predominantemente em cadelas inteiras enquanto o subtipo HER-2 positivo se associou tendencialmente a índices de Ki-67 mais baixos. O subtipo Luminal B foi associado significativamente à ocorrência de metastização regional e verificou-se uma tendência para se verificar mais frequentemente em animais com apresentação de apenas um tumor, e em tumores com necrose intratumoral. Consideramos que a ausência de informações relativas à expressão de RE pode ter condicionado em muito os resultados obtidos quanto à classificação molecular. Permanece incerto o valor prognóstico do sub-tipo tumoral HER-2 positivo pela forma como se relacionou com as restantes variáveis.

As conclusões deste trabalho permitem responder aos objetivos propostos, no sentido em que possibilitaram uma caracterização dos TMC a partir dos dois paradigmas de entendimento dos tumores mamários (o paradigma anterior aos estudos destes por *microarrays* e o que se seguiu, com o início da caracterização por subtipos moleculares). Conseguimos neste trabalho verificar que os fatores de valor prognóstico conhecido e provado se associam, na generalidade, da forma

que é conhecida e expectável, sendo também possível confirmar este facto pelos estudos de sobrevivência (neste caso mais pela análise dos TS e TLD em meses que pelo de valor de significância em si).

Consideramos que no decorrer de um trabalho com estes objetivos, o exercício comparativo com trabalhos anteriores se torna extremamente difícil pela disparidade de métodos de tratamento de amostras, de protocolos imunohistoquímicos, de critérios de avaliação de expressão de cada dos marcadores e de classificação destes tumores. Somos veementemente da convicção de que é fundamental a elaboração de um protocolo unificador que inclua todos os passos necessários ao estudo, da recolha de dados e escolha de amostras até à análise e interpretação de resultados. Estabelecer novos consensos e alargar o espectro de *guidelines* que Peña (2014) iniciou e que nos serviu de linha condutora para o estudo imunohistoquímico.

Optámos por fazer uma análise relativamente exaustiva à amostra que nos foi possível obter, procedendo a estudos associativos e comparativos, mas julgamos que seria importante, com a finalidade de chegar a conclusões com maior força científica, ir constantemente redesenhando e redefinindo critérios amostrais. A representatividade de uma amostra é condição *sine qua non* para garantir o rigor de cada trabalho mas a representatividade amostral pode ser posta em causa pela ausência de representatividade de cada característica quando pretendemos um estudo comparativo ou associativo. Julgamos também que para estudos de prognóstico os estudos de análise multivariada teriam sido uma mais-valia, dada a interferência de “efeitos” de algumas características para a assunção do valor de outras.

Este trabalho deixa várias questões e, conseqüentemente, vários desafios em aberto (mencionados principalmente ao longo da discussão) assim como permite, mesmo a partir dos dados obtidos, a possibilidade de uma continuação do estudo (alargar o tempo de estudos de sobrevivência por curvas de Kaplan-Meier, por exemplo, estaria à distância de uma atualização de informações, de muito fácil e rápida concretização). Consideramos que este foi o último dos objetivos (a que nos tínhamos inicial mas tacitamente proposto) que conseguimos concretizar: avivar a curiosidade, deixar a inquietação de um projeto inacabado, perceber a possibilidade de encontrar ainda mais respostas por querer fazer mais perguntas, deixar acesa a luz que nos impele para a superação e o crescimento no conhecimento. A mudança de paradigmas, mais do que nos fazer sentir perdidos, aproxima-nos de uma realidade que se afigura mais tangível. Como citado no início deste trabalho, “Any knowledge that doesn’t lead to new questions quickly dies out: it fails to maintain the temperature required for sustaining life” (Wisława Szymborska).

Capítulo VIII – Bibliografía

- Abd El-Rehim, D., Pinder, S., Paish, C., Bell, J., Blamey, R., Robertson, J., Nicholson, R. & Ellis, I. (2004). Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. *J Pathol*, 203, 661 – 671.
- Abdel-Hafiz, H.A. & Horwitz, K.B. (2014). Post-translational modifications of the progesterone receptors. *The Journal of Steroid Biochemistry Molecular Biology*, 140, 80-89.
- Adriance, M.C., Inman, J.L., Petersen, O.W. & Bissell, M.J. (2005). Myoepithelial cells: good fences make good neighbors. *Breast Cancer Res*, 7, 190-197.
- 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.
- Ahn, E.R. & Vogel C.L. (2012). Dual HER2-targeted approaches in HER2-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 131 (2), 371-83.
- Alexe, G., Dalgin, G.S., Scandfeld, D., Tamayo, P., Mesirov, J.P., DeLisi, C., Harris, L., Barnard, N., Martel, N., Levine, A.J., Ganesan, S., Bhanot, G. (2007). High expression of lymphocyte-associated genes in node-negative HER2+ breast cancers correlates with lower recurrence rates. *Cancer Res*, 67, 10669 – 10676.
- Allred, D.C., Harvey, J.M. & Berardo, M. (1998). Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol*, 11, 155–168.
- Amirikia, K.C., Mills, P., Bush, J. & Newman, LA. (2011). Higher population-based incidence rates of triple-negative breast cancer among young African-American women: Implications for breast cancer screening recommendations. *Cancer*. 117(12), 2747-53.
- Amorim, R., Sousa, C., Bandarra, E., Sanches, O. & Piza, E. (2008). Immunohistochemical study of estrogen and progesterone receptors and cell proliferative indexes in canine inflammatory mammary carcinoma: 9 cases. *Braz J Vet Pathol*, 1(1), 16 -20.
- Antuofermo, A., Miller, M.A., Pirino, S., Xie, J., Badve, S. & Mohammed, S.I. (2007). Spontaneous Mammary Intraepithelial Lesions in Dogs- A Model of Breast Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 16 (11), 2247-2256.
- Arai, K., Kaneko, S., Naoi, M., Suzuki, K., Maruo, K. & Uehara, K. (1994). Expression of stratified squamous epitheliotype cytoqueratin by canine mammary epithelial cells during tumorigenesis: type I (acidic) 57 kilodalton cytokeratin could be a molecular marker for malignant transformation of mammary epithelial cells. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 56, 51-58.
- Bala, M. (2005). *Clinical studies on the evaluation of doxorubicin as an aduvant chemotherapy for the management of canine mammary neoplasms*. M.V.Sc. Thesis, Punjab Agricultural University, Ludhiana.

- Banks, W.J. (1993). Integumentary system. In W.J. Banks (Ed.), *Applied veterinary histology* (3rd Ed.). (pp.306-311). U.S.A: Mosby.
- Barnard, N.J., Hall, P.A., Lemoine, N.R. & Kadar, N. (1987) Proliferative index in breast carcinoma determined in situ by Ki-67 immunostaining and its relationship to clinical and pathological variables. *J Pathol*, 152, 287–295.
- Barnes, D.M., Millis, R.R., Beex, L.V.A.M. & Thorpe, S.M. (1998) RE: Increased use of immunohistochemistry for oestrogen receptor measurement in mammary carcinoma: the need for quality assurance. *Eur J Cancer*, 34, 1677–1682.
- Barone, R. (1976). *Anatomie comparée des mammifères domestiques*. Lyon: Laboratoire d'Anatomie. Ecole Nationale Veterinaire.
- Bane, A. (2013). Ductal carcinoma *in situ*: what the pathologist needs to know and why. *International Journal of Breast Cancer*, 2013 (914053), 1-7.
- Bearss, J., Schulman, J., & Carter, D. (2012). Veterinary pathology histologic, immunohistochemical, and clinical features of 27 mammary tumors in 18 male dogs. *The American College of Veterinary Pathologists*, 49(4), 602-607.
- Ben-Baruch A. (2003). Host microenvironment in breast cancer development: Inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor – microenvironment interactions. *Breast Cancer Res*, 5, 31 – 36.
- Benjamin, S.A., Lee, A.C. & Saunders, W.J. (1999). Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles. *Veterinary Pathology*, 36, 423 – 436.
- Bergman, P. J. (2007). Mammary gland tumors. International Veterinary Information Service (IVIS) Acedido em Ago 12, 2015. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/lavc/2007/bergman2.pdf>.
- Bertagnolli A. C., Cassali G. D., Genelhu, M. C. L. S., Costa, F. A. Oliveira J. F. C., & Gonçalves, P. B. D. (2009). Immunohistochemical expression of p63 and δ Np63 in mixed tumors of canine mammary glands and its relation with p53 expression,” *Veterinary Pathology*, 46 (3), 407 – 415.
- Bhargava, R., Gerald, W.L., Li, A.R., Pan, Q., Lal, P., Ladanyi, M. & Chen, B. (2005). EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations. *Modern Pathol*, 18,1027-1033.
- Bloom, H.J.G. & Richardson W.W. (1957). Histological grading and prognosis in breast cancer. A study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br. J. Cancer*, 9, 359- 377.
- Boecker, W., Moll, R., Dervan, P., Buerger, H., Poremba, C., Ina, Diallo, R., Herbst, H., Schmidt, A., Lerch, M.M. & Buchwalow, I.B (2002a). Usual ductal hyperplasia of the breast is a committed stem (progenitor) cell lesion distinct from atypical ductal hyperplasia and ductal carcinoma in situ. *J Pathol*, 198,458–467.

- Boecker, W., Moll, R., Poremba, C., Holland, R., Van Diest, P.J., Dervan, P., Burger, H., Wai, D., Ina Diallo, R., Brandt, B., Herbst, H., Schmidt, A., Lerch, M.M. & Buchwallow, I.B. (2002b): Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: a new cell biological concept. *Lab Invest*, 82,737–746.
- Bonnett, B. N. & Egenvall, A. (2010). Age patterns of disease and death in insured Swedish dogs, Cats and Horses. *Journal of Comparative Pathology*, 142(1), 33–38.
- Bostock, D.E. (1975). The prognosis following the surgical excision of canine mammary neoplasms. *Eur J Cancer*, 11, 389–396.
- Bostock, D.E., Moriarty, J. & Crocker, J. (1992). Correlation between histologic diagnosis mean nucleolar organizer region count and prognosis in canine mammary tumors, *Veterinary Pathology*, 29, 381-385.
- Bösze, Z. (Ed): Bioactive Components of Milk. Heidelberg: Springer; 2008.
- Brodey, R.S., Goldschmidt, M.H. & Roszel, J.R. (1983). Canine mammary gland neoplasms. *J Am Animal Hosp Assoc* 19:61-90.
- Bronden, L.B., Nielsen, S.S., Toft, N. & Kristensen, A.T. (2010). Data from the Danish veterinary cancer registry on the occurrence and distribution of neoplasms in dogs in Denmark, *Vet Rec*, 166,586–590.
- Capuco, A.V. & Akers, M. R. (2009). The origin and evolution of lactation. *Journal of Biology*, 8, 37.1-37.4.
- Carey, L.A. (2013) Molecular intrinsic subtypes of breast cancer. In: UpToDate. Hayes DF, Dizon DS (Eds.). Waltham, MA: UpToDate. Acedido em Fev. 7, 2015, disponível em: <http://ww5.komen.org/BreastCancer/DiagnosisReferences.html#sthash.6FDjkAnM.dpuf>
- Carey, L.A., Perou, C.M., Livasy, C.A., Dressler, L.G., Cowan, D., Karaca, G., Troester, M.A., Tse, C.K., Admiston, S., Deming, S.L., Geradts J, Cheang, M.C., Nielsen, T.O., Moorman, P.G., Earp, H.S., & Millikan, R.C. (2006). Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina breast cancer study. *JAMA.*, 95 (21), 2492-2502.
- Carvalho, M.I., Pires, I., Prada, J. & Queiroga, F.L. (2011) T-lymphocytic infiltrate in canine mammary tumours: Clinic and prognostic implications. *In Vivo*; 25:963– 969.
- Cassali GD. *Estudos morfológicos, imunohistoquímicos e citométrico de tumores mamários da cadela – aspectos comparativos com neoplasias da mama humana.* (2000). 73 f. (Doutorado) - Ciência Animal, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.
- Cassali, G. D., Melo, B. M. & Madureira, N. (2008) Mammary gland diagnosis of the laboratory of comparative pathology— UFMG, from 2000 to 2008. *Proceedings of the World Small Animal Veterinary Association*, 14, 173.
- Cassali, G.D., Melo, B.M., & Madureira et al. (2009). Mammary gland diagnosis of the laboratory of comparative pathology- UFMG, from 2000 to 2009. *Proceedings of the*

World Small Animal Veterinary Association, vol 14, p173, São Paulo, Brasil, Clínica Veterinária-supplement.

- Cassali, G., Bertagnolli, A., Ferreira, E., Damasceno, K., Gamba, C., & Campos, C. (2012) Canine mammary mixed tumours: a review. *Veterinary Medicine International*, 274608,1- 7.
- Cassali, G., Lavalle, G., Ferreira, E., Estrela-Lima, A., De Nardi, R, Ghever, C., Sobral, R. et al., (2014) Review article: Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. *Braz J Vet Pathol*, 7(2), 38-69.
- Castagnaro, M., Casalone, C., Bozzetta, E., De Maria, R., Biolatti, B. & Caramelli, M. (1998) Tumour grading and the one-year post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas, *J Comp Pathol*, 119:263-275.
- Cavalcanti, M.F. & Cassali, G.D. (2006) Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas - revisão. *Rev. Clin. Vet*, 11, 56-64.
- Chang, S.C., Chang, C.C., Chang, T.J. & Wong, M.L. (2005). Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998 – 2002). *Journal American Veterinary Medical Association*, 227, 1625 – 1629.
- Cheang, M.C., Voduc, D., Bajdik, C., Leung, S, McKinney, S., Chia, S.K., Perou, C.M., Nielsen, T.O. (2008) Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res*, 1, 14(5), 1368-76.
- Cheang, M.C., Chia, S.K., Voduc, D., Gao, D., Leung, S., Snider, J., Watson, M., Davies, S., Bernard, P.S., Parker, J.S., Perou, C.M., Ellis, M.J. & Nielsen, T.O. (2009). Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 101(10):736-50.
- Clemente, M., De Andres, P.J., Peña, L. & Perez- Alenza, M.D. (2009). Survival time of dogs with inflammatory mammary cancer treated with palliative therapy alone or palliative therapy plus chemotherapy, *Vet Rec* 165, 78–81.
- Clemente, M., Perez-Alenza, M.D., Illera, J.C. & Peña, L. (2010a). Histological, immunohistological, and ultrastructural description of vasculogenic mimicry in canine mammary cancer. *Vet Pathol*, 47, 265–274.
- Clemente M, Perez-Alenza MD, Peña L. (2010b) Metastasis of canine inflammatory versus non-inflammatory mammary tumours. *J Comp Pathol*.143:157–163.
- Colombo, P., Milanezi, F., Weigelt, B., & Reis-filho, J. S. (2011). Microarrays in the 2010s : the contribution of microarray-based gene expression profiling to breast cancer classification , prognostication and prediction. *Breast Cancer Research*, 13, (212).
- Cork, D., Lennard, T., & Tyson-Capper, A. (2008). Alternative splicing and the progesterone receptor in breast cancer,” *Breast Cancer Research*, 10(3), 207.
- Cotchin, E. (1947) Some glandular tumours of the dog. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 40 (11), 636 –638.

- Coussens, L., Yang-Feng, T.L., Liao, Y.C., Chen, E., Gray, A. & McGrath, J. (1985). Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*, 230: 1132-9.
- Coussens, L.M. & Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420, 860–867.
- Cui, X., Schiff, R., Arpino, G., Osborne, C.K. & Lee, A.V. (2005). Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy. *J Clin Oncol*, 23,7721 – 7735.
- Cunningham, J.G (2007). The mammary gland. In J.G. Cunningham & G.K. Bradley, *Textbook of veterinary physiology* (4th Ed.) Missouri: Saunders Elsevier.
- Curigliano G1, Criscitiello C, Andrè F, Colleoni M & Di Leo A. (2013). Highlights from the 13th St Gallen International Breast Cancer Conference 2013. Access to innovation for patients with breast cancer: how to speed it up? *Ecancermedalscience*, 7:299.
- Dairkee SH, Ljung BM, Smith H & Hackett A. (1987a). Immunolocalization of a human basal epithelium specific keratin in benign and malignant breast disease. *Breast Cancer Res Treat*, 10,11 – 20.
- Dairkee, S.H., Mayall, B.H., Smith, H.S., Hackett, A.J. (1987b). Monoclonal marker that predicts early recurrence of breast cancer. *Lancet*, 1:514.
- Dawood, S., Broglio, S., Buzdar, A., Hortobagyi, G. & Giordano, S. (2010). Prognosis of women with metastatic breast cancer by her2 status and trastuzumab treatment: an institutional-based review. *J Clin Onc*, 28(1), 92-98.
- De Abreu, F.B., Schwartz, G.N., Wells, W.A. & Tsongalis, G.J. (2013). The Emerging Role of the Molecular Diagnostics Laboratory in Breast Cancer Personalized Medicine. *The American Journal of Pathology*, 183, 1075-1083.
- 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 Res Treat*, 80 (3), 363-7.
- De las Mulas, J.M., Ordás, J., Millán, M.Y., Chacón, F., De Lara, M., Espinosa de los Monteros, A., Reymundo, C. & Jover A. (2004). Immunohistochemical Expression of Estrogen Receptor β in Normal and Tumoral Canine Mammary Gland. *Veterinary Pathology*, 41(3), 269-272.
- De Las Mulas, J., Millán, Y. & Dios, R. (2005). A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor α 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
- De M. Souza, C.H., Toledo-Piza, E., Amorim, R.,Barboza, A. & Tobias, K.M. (2009). Inflammatory mammary carcinoma in 12 dogs: clinical features, cyclooxygenase-2 expression, and response to piroxicam treatment. *Can Vet J* 50, 506–510.

- De Oliveira, J.T., Pinho, S.S., de Matos, A.J., Hespanhol, V., Reis, C.A. & Gartner F. (2009) MUC1 expression in canine malignant mammary tumours and relationship to clinicopathological features. *Vet J*, 182:491 – 493.
- Dellman, H. & Eurell, J. A. C. (1998). Textbook of Veterinary Histology (5th Ed.) New York: John Wiley & Sons.
- DeNardo, D.G. & Coussens, L.M. (2007) Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: Crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Res*;9:212.
- Deng, C.X. & Scott, F. (2000) Role of the tumor suppressor gene Brca1 in genetic stability and mammary gland tumor formation. *Oncogene*, 19(8):1059-1064.
- Ding, Y & Ruan, Q (2006). The value of p63 and CK5/6 expression in the differential diagnosis of ductal lesions of breast, *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 6 (4),405-7.
- Direção Geral de Saúde (2013) Portugal Dornças Oncológicas em Números – 2013, Programa Nacional para as Doenças Oncológicas. Lisboa: DGS. Disponível em <http://www.dgs.pt/estatisticas-de-saude/estatisticas-de-saude/publicacoes/portugal-doencas-oncologicas-em-numeros-2013.aspx>
- Dobson, J.M., Samuel, S., Milstein, H., Rogers, K. & Wood, J.L. (2002). Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs, *J Small Anim Pract* 43 (6), 240–246.
- Dobson, M.J. & Lascelles B.D.X. (2011). *BSAVA Manual of canine and feline oncology*, 3rd ed, British Small Animal Veterinary Association (Gloucester). pp. 244-253.
- Dobson, J. M. (2013). Breed-predispositions to cancer in pedigree dogs. *ISRN Veterinary Science*, 2013, Article ID 941275, 1-23.
- Dominguez, P.A., Dervis, N.G., Cadile, C.D., Sarbu, L. & Kitchell, B.E. (2009). Combined Gemcitabine and carboplatin therapy for carcinomas in dogs. *J Vet Intern Med*, 23, 130–137.
- Donnay, I, Rautis, J., Wouters-Ballman, P., Devleeschouwer, N., Leclercq, G., Verstegen, J.P. (1993). Receptors for oestrogen, progesterone and epidermal growth factor in normal and tumorous canine mammary tissues. *J Repr Fertil Suppl*, 47:501-512.
- Donnay, I., Rautis, J., Devleeschouwer, N., Wouters-Ballman, P., Leclercq, G., Verstegen, J. (1995). Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs, *Am J Vet Res*, 56,1188 – 1194, 1.
- Donnay, I., Devleeschouwer, N., Wouters-Ballman, P., Leclercq, G. & Verstegen, J. (1996). Relationship between receptors for epidermal growth factor and steroid hormones in normal, dysplastic and neoplastic canine mammary tissues. *Res Vet Sci* 60:251-254.
- Dorn, C.R., Taylor, D.O., Schneider, R., Hibbard, H.H. & Klauber M.R. (1968) Survey of animal neoplasms in alameda and contra costa counties, california. ii. Cancer morbidity in dogs and cats from alameda county. *J Natl Cancer Inst*, 40, 307 –318.

- Dowsett, M., Sestak, I., Lopez-Knowles, E., Sidhu, K., Dunbier, A.K. & Cowens, J.W. (2013). Comparison of PAM50 risk of recurrence score with oncotype DX and IHC4 for predicting risk of distant recurrence after endocrine therapy. *J Clin Oncol*; 31: 2783–2790.
- Dunbier, A.K., Anderson, H., Folkerd, E.J., Ghazoui, Z, Smith, I.E., Ellis, M.J., Dowset, M. & Neoadjuvant Letrozole Study Group (2009). Expression of estrogen responsive genes in breast cancers correlates with plasma estradiol levels in postmenopausal women. Presented at the 31st Annual San Antonio Breast Cancer Symposium, San Antonio, Texas, December 13.
- Dunne, B., Lee, A.H., Pinder, S.E., Bell, J.A., Ellis, I.O. (2003). An immunohistochemical study of metaplastic spindle cell carcinoma, phyllodes tumor and fibromatosis of the breast. *Hum Pathol* 34:1009–1015.
- Dutra, A.P., Granja, N.V., Schmitt, F.C & Cassali, G.D. (2004). C-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. *Braz J Med Biol Res*, 37(11), 1673-8.
- Dutra, A.P., Azevedo Junior, G.M., Schmitt, F.C. & Cassali, G.D. (2008). Assessment of cell proliferation and prognostic factors in canine mammary gland tumors. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, 60, 1403-12.
- Easton, D.F, Ford, D. & Bishop, D.T. (1995). Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast cancer linkage consortium. *Am J Hum Genet*, 56(1), 265- 271.
- Eerola, H., Heinonen, M., Heikkilä, P., Kilpivaara, O., Tamminen, A., Aittomäki, K., Blomqvist, C., Ristimäki, A. & Nevanlinna, H. (2008). Basal, cytokeratins in breast tumours among BRCA1, BRCA2 and mutation-negative breast cancer families. *Breast Cancer Res*, 10(1):R17.
- 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. *Preventive Veterinary Medicine*, 69 (1-2), 109-27.
- Eisen, A., Lubinski, J., Klijn, J., Moller, P., Lynch, H.T., Offit, K., Weber, B., Rebbeck, T., Neuhausen, S.L., Ghadirian, P., Foulkes, W.D., Gershoni-Baruch, R., Friedman, E., Rennert, G., Wagner, T., Isaacs, C., Kim-Sing, C., Ainsworth, P., Sun, P. & Narod, S.A. (2005). Breast cancer risk following bilateral oophorectomy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: an international case–control study. *J Clin Oncol* 23, 7491–7496.
- Else, R. & Hannant, D. (1979): Some epidemiological aspects of mammary neoplasia in the bitch. *Vet Rec* 104:296–304.
- Elston CW & Ellis IO. (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term followup. *Histopathology* 19:403–410.

- Elston CW & Ellis IO. (1998). Assessment of histological grade. In: Systemic Pathology – The Breast. CW Elston and IO Ellis (Eds.), 3rd Ed., vol. 13. Churchill and Livingstone, London, pp. 365–384.
- 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.
- Estrela-Lima, A., Araujo, M.S., Costa-Neto, J.M., Carvalho, N., Barrouin-Melo, S, Cardoso, S., Martins-Filho, O., Serakides, R. & Cassali, G. (2010). Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. *BMC Cancer*, 10:256.
- Estrela-Lima, A., Araújo, M., Soares, R., Ribeiro, L., Damasceno, K., Costa, A., Teixeira-Carvalho, A., Martins-Filho, O. & Cassali G. (2013) Plasma biomarkers profile of female dogs with mammary carcinomas association with clinical and pathological features. *Vet Comp Oncology*. 2013:10, 1-13.
- Falck, A.K., Fernö, M., Bendahl, P.O. & Rydén, L. (2013). St Gallen molecular subtypes in primary breast cancer and matched lymph node metastases--aspects on distribution and prognosis for patients with luminal A tumours: results from a prospective randomised trial. *BMC Cancer*, 25, 13:558.
- Ferguson, H.R. (1985). Canine mammary gland tumors. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 15:501-511.
- Ferreira, E., Bregunci G.C., Schmitt, F.C. & Cassali, G.D. (2003) Protocol for the anatomopathological examination of canine mammary tumors. *Arq Bras Med. Vet Zootec*, 55, 105- 09.
- Ferreira, E., Bertagnolli, A.C., Cavalcant, M.F., Schmitt, F.C. & Cassali G.D. (2009). The relationship between tumor size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumors. *Vet. Com. Oncol*, 193, 1-6.
- Flores, M. & Castaño, M. (2000). Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Veterinary Pathology*, 37(3), 239-247.
- Fonseca, C., & Daleck, C. (2000). Canine mammary tumors: hormonal influence and effects of ovariectomy as an adjuvant therapy. *Ciência Rural*, 30 (4) 731-735.
- 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.
- Fowler, E.H., Wilson, G.P. & Koester, A. (1974). Biologic behaviour of canine mammary neoplasms based on a histogenetic classification. *Vet Pathol* 11: 212-229.
- Funakoshi, Y., Nakayama, H., Uetsuka, K., Nishimura, R., Sasaki, N. & Doi, K. (2000). Cellular proliferative and telomerase activity in canine mammary gland tumors. *Vet Pathol* 37: 177-183.

- Galan, M., Vinolas, N., Colome, D., Soler, G., Munoz, M., Longaron, R., Ventura, P.J., Gascon, P. & Estape, J. (2002). Detection of occult breast cancer cells by amplification of CK19 mRNA by reverse transcriptase polymerase chain reaction: role of surgical manipulation. *Anticancer Res* 22, 2877 – 2884.
- Gama, A., Alves, A., Gartner, F. & Schmitt, F. (2003). P63: a novel myoepithelial cell marker in canine mammary tissues. *Veterinary Pathology*, 40, 412-420.
- Gama, A., Alves, A. Schmitt, F. (2008a). Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Arch*, 453, 123-132.
- Gama, A., Paredes, J., Gärtner F., Alves, A., Schmitt, F. (2008b) Expression of E cadherin, P-cadherin and β -catenin in canine malignant mammary tumors in relation to clinicopathological parameters, proliferation and survival. *Vet. J*, 177, 45-53.
- Gama, A., Gartner, F., Alves, A. & Schmitt, F. (2009). Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in canine mammary tissues. *Research Veterinary Science*, 87, 432-437.
- Gama, A., Alves, A. & Schmitt, F. (2010). Expression and prognostic significance of CK19 in canine malignant mammary tumours. *Vet J*, 184:45–51.
- Gartner, F., Geraldles, M., Cassali, G., Rema, A. & Schmitt, F. (1999). DNA measurement and immunohistochemical characterization of epithelial and mesenchymal cells in canine mixed mammary tumors: putative evidence for a common histogenesis. *Veterinary Pathology*, 158(1), 39-47.
- Gamblin, R.M., Sagartz, J.E. & Couto C.G. (1997). Overexpression of p53 tumor suppressor protein in spontaneously arising neoplasms of dogs. *Am J Vet Res*, 58(8):857-863.
- Gasparini, G., Boracchi, P., Verderio, P. & Bevilacqua, P. (1994). Cell kinetics in human breast cancer: comparison between the prognostic value of the cytofluorimetric S-phase fraction and that of the antibodies to Ki-67 and PCNA antigens detected by immunocytochemistry. *Int J Cancer*, 57:822–829.
- Geraldles, M., Gartner, F. & Schmitt, F. (2000). Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours. *Vet Rec* 146:403 – 406.
- Gerdes, J., Lemke, H. Baisch, H., Wacker, H.H., Schwab, U. & Stein, H. (1984). Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *Journal of Immunology*, 133: 1710-1715.
- Getty, R. (1981a). Aparelho urogenital dos carnívoros. In R., Getty (Ed). *Sisson/Grossman - anatomia dos animais domésticos* (5ª edição). Rio de Janeiro: Interamericana.
- Getty, R. (1981b). Sistema linfático do carnívoro. In R., Getty (Ed). *Sisson/grossman - anatomia dos animais domésticos* (5ª edição). Rio de Janeiro: Interamericana.

- Gilbertson, S. R., Kurzman, I. D., Zachrau, R. E., Hurvitz, A. I. & Black, M. M. (1983). Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Veterinary Pathology*, 20, 127 – 142.
- Gnant, M., Filipits, M. Greil, R., Stoeger, H., Rudas, M., Bago-Horvath, Z. (2014). Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group. Predicting distant recurrence in receptor-positive breast cancer patients with limited clinicopathological risk: using the PAM50 Risk of Recurrence score in 1478 postmenopausal patients of the ABCSG-8 trial treated with adjuvant endocrine therapy alone. *Ann Oncol*; 25: 339– 345.
- Goldhirsch, A., Ingle, J.N., Gelber, R.D., Coates, A.S., Thurlimann, B. & Senn, H.J. (2009). Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol*, 20:1319-1329.
- Goldhirsch, A., Wood, W.C., Coates, A.S., *et al.* (2011). Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann. Oncol*, 22, 1736-1747.
- Goldhirsch, A., Winer, E.P., Coates, A.S., *et al.* (2013). Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann. Oncol.*, 24, 2206 2223.
- Goldman, A.S. (2002) Evolution of the mammary gland defense system and the ontogeny of the immune system. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 7:277-289.
- Goldschmidt, M., Peña, L., Rasotto, R. & Zappulli, V. (2011) Classification and grading of mammary tumors, *Vet Pathol*, 48, 117–131.
- Graham, J.C., O’Keefe & D.A., Gelberg, H.B. (1999). Immunohistochemical assay for detecting estrogen receptors in canine mammary tumors. *Am J Vet Res* 60:627–630.
- Griffey, S.M., Madewell, B.R., Dairkee, S.H., Hunt, J.E., Naydan, D.K. & Higgins, R.J. (1993). Immunohistochemical reactivity of basal and luminal epithelium-specific cytokeratin 30 antibodies within normal and neoplastic canine mammary glands. *Vet Pathol*, 30:155- 161.
- Gudjonsson, T., Rønnov-Jessen, L., Villadsen, R., Rank, F., Bissell, M. & O. Petersen, W. (2002). Normal and tumor-derived myoepithelial cells differ in their ability to interact with Luminal breast epithelial cells for polarity and basement membrane deposition, *Journal of Cell Science*, 115 (1), 39–50.
- 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.
- Gupta P. (2008) *Diagnosis of canine mammary neoplasms and their management with adjuvant chemotherapy using vincristine, methotrexate and cyclophosphamide*. M.V.Sc. Thesis, Guru Angad Dev Veterinary and Animal Sciences University. Ludhiana.

- Gupta, K., Sood, N.K., Uppal S.K., Mohindroo, J., Mahajan, S., Raghunath, M. & Singh, K. (2012). Epidemiological Studies on Canine Mammary Tumour and its Relevance for Breast Cancer Studies. *IOSR Journal of Pharmacy*, 2 (2), 322-333.
- Gusterson, B.A., Ross, D.T., Heath, V.J. & Stein, T. (2005). Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. *Breast Cancer Res* 7:143-148.
- Gutierrez, C. & Schiff R. (2011). HER-2: biology, detection, and clinical implications. *Arch Pathol Lab Med*, 135 (1), 55-62.
- Hall, J.M., Lee, M.K. & Newman, B. (1990) Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science*, 250(4988), 1684-1689.
- Hamelers, I.H., van Schaik, R.F. & van Teeffele, H.A. (2002) Synergistic proliferative action of insulin-like growth factor I and 17 beta-estradiol in MCF-7S breast tumor cells, *Exp Cell Res* 273:107–117.
- Hammond, M.E.H., Hayes, D.F., Dowsett, M., et al. (2010). American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer (Unabridged Version). *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 134, 48-72.
- Hampe, J.F., Misdorp, W. (1974). Tumours and dysplasias of the mammary gland. *Bull World Health Organ*, 50(1-2), 111-33.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-674.
- Hefti, M., Hu, R., Knoblauch, N., Collins, L., Haibe-Kains, B., Tamimi, R. & Ceck, A. (2013) Estrogen receptor negative/progesteron receptor positive breast cancer is not a reproducible subtype. *Breast Cancer Research*, 15:R68.
- Hellmén, E. & Lindgren, A. (1989). The expression of intermediate filaments in canine mammary glands and their tumors. *Vet Pathol* 26:420-428.
- Hellmén, E., Bergstrom, R., Holmberg, L., Spångberg, I.B., Hansson, K. & Lindgren, A. (1993). Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. *Veterinary Pathology*, 30, 20-27.
- Hellmén, E. (2014) Canine mammary osteosarcomas. *J Veterinar Sci Technolo*, 5:2, 1-6.
- Heng, H.H. (2007) Cancer genome sequencing: the challenges ahead, *Bioessays* 29:783–794.
- Hermo, G.A., Torres, P., Ripoll, G.V., Scursioni, A.M., Gomez, D.E., Alonso, DF. & Gobello, C. (2008). Perioperative desmopressin prolongs survival in surgically treated bitches with mammary gland tumours: a pilot study. *Vet J* 178, 103 – 108.

- Hermo, G.A., Turic, E., Angelico, D., Scursoni, A.M., Gomez, D.E., Gobello, C. & Alonso, D.F (2011). Effect of adjuvant perioperative desmopressin in locally advanced canine mammary carcinoma and its relation to histologic grade. *J Am Anim Hosp Assoc* 47, 21 – 27.
- Hoang, M.P., Sahin, A.A., Ordóñez, N.G. & Sneige, N. (2000). HER-2/neu gene amplification compared with HER-2/neu protein overexpression and interobserver reproducibility in invasive breast carcinoma. *Am J Clin Pathol*, 113 (6):852-9.
- Holbro, T. & Hynes, N.E. (2004). ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 44:195-217.
- 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. *Veterinary Journal*, 180, 116 – 123.
- Hsu, H., Lin, H., Chiou, S., Chang, C., Wang, S., Lin, K., Chulakasian, S., Wong, M. & Chang, S. (2010). Mouse mammary tumor virus-Like nucleotide sequences in canine and feline mammary tumors. *Journal of clinical microbiology*, 48 (12), 4354-4362.
- Hu, Z., Fan, C., Oh, D.S., Marron, J.S., He, X., Qaqish, B.F., Livasy, C., Carey, L.A., Reynolds, E., Dressler, L., Nobel, A., Parker, J., Ewend, M.G., Sawyer, L.R., Wu, J., Liu, Y., Nanda, R., Tretiakova, M., Ruiz Orrico, A., Dreher, D., Palazzo, J.P., Perreard, L., Nelson, E., Mone, M., Hansen, H., Mullins, M., Quackenbush, J.F., Ellis, M.J., Olopade, O.I., Bernard, P.S. & Perou, C.M. (2006). The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics*, 7, 96.
- Hunley, D., Mauldin, D., Shiomitsu, K. & Mauldin, G. (2010). French_Clinical outcome in dogs with nasal tumors treated with intensity-modulated radiation therapy. *Can Vet J*, 51 (3): 293– 300.
- Hynes, N.E. & Lane, H.A. (2005). ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*, 5 (5):341-54.
- Im, K.S., Kim, N.H., Lim, H.Y., Kim, H.W., Shin, J.I. & Sur, J.H. (2014). Analysis of a new histological and molecular-based classification of canine mammary neoplasia. *Vet Pathol*, 51(3):549-559.
- International Agency for Research on Cancer (2008). *World Cancer Report 2008*. Acedido em Out. 26, 2015. Disponível em <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2008/>
- International Agency for Research on Cancer (2014). *World Cancer Report 2014* World Health Organization 2015. Acedido em Nov 29, 2015. Disponível em https://med.unsw.edu.au/sites/default/files/local_upload/others/World-Cancer-Report-2014-Press-Release.pdf
- Jabara, A.G. (1960). Canine mixed tumours. *The Australian Veterinary Journal*, 36 (5) 212 – 221.
- Jabara, A.G. (1969). Two cases of mammary neoplasms arising in male dogs. *Aust Vet J.*, 45, 476-480.

- Jain V. 2006. *Studies on management of canine mammary neoplasms by adjuvant chemotherapy using combination of doxorubicin and cyclophosphamide*. M.V.Sc. Thesis, Guru Angad Dev Veterinary and Animal Sciences University, Ludhiana.
- Jimenez, R.E., Wallis, T., Tabaszka, P. & Visscher, D.W. (2000). Determination of Her-2/Neu status in breast carcinoma: comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol*, 13 (1):37-45.
- Johansson, M., Tan, T., de Visser, K.E. & Coussens, L.M. (2007). Immune cells as anti-cancer therapeutic targets and tools. *J Cell Biochem* 101:918 – 926.
- Junqueira, L.C. & Carneiro, J. (2008). Aparelho reprodutor feminino. In L. C., Junqueira & J., Carneiro (Eds), *Histologia básica* (11ª edição). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Kadthur, J., Rao, Sonnahallipura, B, Thimmanahalli, D. & Laxmikanth, S. (2011). Prognostic value of Ki 67 proliferation antigen in canine malignant mammary gland tumours. *Braz J Vet Pathol*, 4(1), 36-40.
- Karayannopoulou, M., Kaldrymidou, E., Constantinidis, T.C. & Dessiris, A. (2001). Adjuvant post-operative chemotherapy in bitches with mammary cancer. *Journal of Veterinary Medicine*, 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. *Journal of Comparative Pathology*, 133, 246 – 252.
- Kaufmann, J.E. & Vischer, U.M. (2003). Cellular mechanisms of the hemostatic effects of desmopressin (DDAVP). *J Thromb Haemost*, 1, 682–689.
- Kennel Club/British Small Animal Veterinary Association Scientific Committee. Purebred Dog Health Survey 2004, Acedido em Mar, 5, 2015. Disponível em <http://www.thekennelclub.org.uk/item/549>.
- Khanna, C., Lindblad-Toh, K., Vail D., London, C., Bergman, P., Barber, L., Breen, M., Kitchell, B. McNeil, E., Modiano, J., Niemi, S, Comstock, K., Ostrander, E., Westmoreland, S. & Withrow, S. (2006). The dog as a cancer model. *Nature Biotechnology*, 24, 1065–1066.
- Kim, K., Chie, E.K., Han, W., Noh, D.Y., Park, I.A., Oh, D.Y., Im, S.A., Kim, T.Y., Bang, Y.J. & Há, S.W. (2010). Prognostic value of p53 and bcl- 2 expression in patients treated with breast conservative therapy. *J Korean Med Sci* 25: 235-239.
- Kim, J.H., Chon, S., Im, K., Kim N. & Sur, N. (2013a). Correlation of tumor-of tumor infiltrating lymphocytes to histopathological features and molecular phenotypes in canine mammary carcinoma: A morphologic and immunohistochemical morphometric study. *Can J Vet Res*, 77 (2), 142-149.
- Kim, N.H., Lim, H.Y., Im, K.S., Kim, J.H. & Sur, J H. (2013b). Identification of triple-negative and basal-like canine mammary carcinomas using four basal markers. *J Comp Pathol*, 148(4), 298-306.

- Klijn, J.G., Berns, P.M., Schmitz, P.I. & Foekens, J.A. (1992). The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. *Endocr Rev* 13:3 – 17.
- Klijn, J.G., Setyono-Han, B & Foekens, J.A. (2000). Progesterone antagonists and progesterone receptor modulators in the treatment of breast cancer. *Steroids* 65, 825–830.
- Klopfleisch, R. & Gruber, A.D. (2009). Increased expression of BRCA2 and RAD51 in lymph node metastases of canine mammary adenocarcinomas, *Vet Pathol* 46:416 – 422.
- Klopfleisch, R., von Euler, H., Sarli, G., Pinho, S., Gartner, F. & Gruber, A., (2011). Molecular Carcinogenesis of canine mammary tumors: news from an old disease. *Veterinary Pathology*, 48 (1) 98-116.
- Knapp, D.W. & Waters, D.J. (1997). Naturally occurring cancer in pet dogs: important models for developing improved cancer therapy for humans. *Molecular Medicine Today*; 3, 8 – 11.
- Köning, H.E., (2004). Glândula mamária nos animais domésticos. In H.E., König, H. Liebich, *Anatomia dos animais domésticos: texto e atlas colorido*. Porto Alegre: Artmed.
- Korsching, E., Packeisen, J., Agelopoulos, K., Eisenacher, M., Voss, R., Isola, J., van Diest, P.J., Brandt, B., Boecker, W. & Buerger, H. (2002) Cytogenetic alterations and cytokeratin expression patterns in breast cancer: integrating a new model of breast differentiation into cytogenetic pathways of breast carcinogenesis. *Lab Invest*, 82:1525-1533.
- Kozakiewicz, A.M. (2012). 12_Prospective Study of tumor markers as prognostic factors in the histopathological differential diagnosis of mammary gland neoplasms in female canines. In Dr. Carlos C. Perez-Marin (Ed.), *A Bird's Eye View on Veterinary Medicine*. (pp. 199-230). InTech, Croatia.
- Kumaraguruparan, R., Prathiba, D. & Nagini, S. (2006). Of humans and canines: immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours. *Research in Veterinary Science*, 81(2), 218-224.
- Kurzman, I.D. & Gilbertson, S.R. (1986). Prognostic factors in canine mammary tumors. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery*, 1, 25 – 32.
- Laakso, M., Loman, N., Borg, A. & Isola, J. (2005). Cytokeratin 5/14-positive breast cancer: true basal phenotype confined to BRCA1 tumors. *Mod Pathol* 18:1321-1328.
- Lacroix-Triki, M., Mery, E., Voigt, J.J., Istier, L. & Rochaix, P. (2003). Value of cytokeratin 5/6 immunostaining using D5/16 B4 antibody in the spectrum of proliferative intraepithelial lesions of the breast. A comparative study with 34bE12 antibody. *Virchows Arch* 442: 548–554.
- Lana, S.E., Rutteman, G.R. & Withrow, S.J. (2007). Tumors of the mammary gland. In: Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. 4th ed. Withrow SJ, Vail DM, eds. St. Louis, MO: Saunders Elsevier; 2007:619–636.

- Langenbach, A., McManus, P., Hendrick, M., Shofer, F.S. & Sorenmo, K.U. (2001). Sensitivity and specificity of methods of assessing the regional lymph nodes for evidence of metastasis in dogs and cats with solid tumors. *J Am Vet Med Assoc* 218:1424–1428.
- Lavalle, G.E., Bertagnolli, A.C., Tavares, W.L. & Cassali, G.D. (2009). Cox-2 expression in canine mammary carcinomas: correlation with angiogenesis and overall survival. *Vet Pathol*, 46, 1275 – 1280.
- Lee, C. & Kweon, O. (2002). Mutations of *p53* tumor suppressor gene in spontaneous canine mammary tumors. *J. Vet. Sci*, 3 (4), 321-325.
- Lee, C., Kim, W., Lim, J., Kang, M., Kim, D. & Kweon, O. (2004). Mutation and overexpression of *p53* as a prognostic factor in canine mammary tumors. *J. Vet. Sci*, 5 (1), 63-69.
- Leonardi, E., Girlando, S. & Serio, G. (1992) PCNA and Ki-67 expression in breast carcinoma: correlations with clinical and biological variables. *J Clin Pathol* 45:416–419.
- Ley, T.J., Mardis, E.R., Ding, L., Fulton, B., McLellan, M., Chen, K., Dooling, D., Dunford-Shore, B., McGrath, S., Hickenbotham, M., Cook, L., Abbott, R., Larson, D., Koboldt, D., Pohl, C., Smith, S., Hawkins, A. & Abbott, S. (2008). DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome, *Nature* 456:66–72.
- Lindblad-Toh, K., Wade, C.M., Mikkelsen, T.S., Karlsson, E.K., Jaffe, D.B., Kamal, M., Clamp, M., Chang, J.L., Kulbokas, E.J. & Zody, M.C. (2005) Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 438:803–819.
- Livasy, C.A., Karaca, G., Nanda, R., Tretiakova, M.S., Olopade, O.I., Moore, D.T. & Perou, C.M. (2006). Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol*, 19 (2):264-71.
- Livasy, C.A., Perou, C.M., Karaca, G., Cowan, D.W., Maia, D., Jackson, S., Tse, C.K., Nyante, S. & Millikan, R.C. (2007). Identification of a basal-like subtype of breast ductal carcinoma in situ. *Hum Pathol*. 38(2):197-204.
- Losco, P.E. (1986). Local and Peripheral Eosinophilia in a Dog with Anaplastic Mammary Carcinoma. *Vet. Pathol*. 23:536–538.
- Louis, L., Varshney, C. & Nair, M. (2012). An Immunohistochemical Study on the Expression of Sex Steroid Receptors in Canine Mammary Tumors. *ISRN Veterinary Science* 378607, 1-7.
- Lopuszynski, W. & Hellmén, E. (2015). Cell proliferation study in canine mammary carcinomas- case study. *Int J Vet Health Sci Res*. 3(2), 39-45.
- Lyons, T., Schedin, P. & Borges, V (2009). Pregnancy and breast cancer: when they collide. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 14(2), 87-98.
- MacEwen, E.G., Patnaik, A.K., Harvey, H.J. & Panko, W.B. (1982). Estrogen receptors in canine mammary tumors. *Cancer Research*, 42, 2255-2259.

- MacEwen, E.G. (1990). Spontaneous tumors in dogs and cats: models for the study of cancer biology and treatment. *Cancer and Metastasis Reviews*, 9(2), 125-136.
- Madewell, B.R. & Theilen, G.H. (1987). Tumors of the mammary gland. In G.H. Theilen & B.R. Madewell (Eds.), *Veterinary cancer medicine* (pp.327-344). Philadelphia: Lea & Febiger.
- Maguire, H.C. Jr & Greene, M.I. (1989). The neu (c-erbB-2) oncogene. *Semin Oncol*, 16(2):148-55.
- Maguire, H.C. Jr. & Greene, M.I. (1990). Neu (c-erbB-2), a tumor marker in carcinoma of the female breast. *M.I., Pathobiology*. 58(6):297-303.
- Malzahn, K., Mitze, M., Thoenes, M. & Moll, R. (1998). Biological and prognostic significance of stratified epithelial cytokeratins in infiltrating ductal breast carcinomas. *Virchows Arch* 433:119-129.
- Man, Y.G. & Sang, Q.X.A. (2004) The significance of focal myoepithelial cell layer disruptions in human breast tumor invasion: a paradigm shift from the "protease-centered" hypothesis. *Experimental Cell Research*, 301 (2), 103 – 118.
- Marconato, L., Lorenzo, R.M., Abramo, F., Ratto, A., Zini, E. (2008). Adjuvant gemcitabine after surgical removal of aggressive malignant mammary tumours in dogs, *Vet Comp Oncol*, 6, 90–101.
- Marconato, L., Romanelli, G., Stefanello, D., Giacoboni, C., Bonfanti, U, Bettini G, Finotello, R., Verganti, S., Valenti, P., Ciaramella, L., & Zini, E. (2009). Prognostic factors for dogs with mammary inflammatory carcinoma: 43 cases (2003–2008) *J Am Vet Med Assoc* 235:967–972.
- Marconato, L., Gelain, M. E. & Comazzi, S. (2013). The dog as a possible animal model for human non Hodgkin lymphoma: a review. *Hematological Oncology*, 31 (1), 1-9.
- Mariotti, M., Giacomo, R., & Subeide, M. (2013). Immunohistochemical Evaluation of Ovarian Hormonal Receptors in Canine Mammary Tumors. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 3, 104-110
- Matos, I., Dufloth, R., Alvarenga, M., Zeferino, L.C. & Schmitt, F. (2005). p63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. *Virchows Arch* 447: 688– 694.
- Matos, A.J.F., Lopes, C., Carvalheira, J., Santos M., Ruttenab G.R. & Gartner, F. (2006) E cadherin expression in canine malignant mammary tumours: relationship to other clinico-pathological variables. *J Comp Pathol*, 134:182–189.
- 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, *Veterinary embryology*. Oxford: Blackell Publishing.
- Merlo, D.F., Rossi, L., Pellegrino, C., Ceppi, M., Cardellino, U., Capurro, C., & Ratto, A. (2008). Cancer incidence in pet dogs: findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy, *J Vet Intern Med*, 22:976–984.

- Millanta, F., Calandrella, M., Bari, G., Niccolini, M., Vannozzi I. & Poli A. (2005). Comparison of Steroid Receptor Expression in Normal Dysplastic and Neoplastic Canine and Feline Mammary Tissues, *Research in Veterinary Science*, 79(3), 225-232.
- Millanta, F., Citi, S, Della Santa, D., Porciani, M. & Poli, A. (2006a). COX-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. *Breast Cancer Res Treat*; 98:115–120.
- Millanta F., Silvestri, G., Vaselli, C., Citi, S., Pisani, G., Lorenzi, D. & Poli, A. (2006b). The role of vascular endothelial growth factor and its receptor Flk-1/KDR in promoting tumour angiogenesis in feline and canine mammary carcinomas: a preliminary study of autocrine and paracrine loops. *Res Vet Sci*.81:350–357.
- Misdorp, W., Cotchin, E., Hampe, J. F., Jabara, A. G. & von Sandersleben, J. (1972). Canine malignant mammary tumours. II. Adenocarcinomas, solid carcinomas and spindle cell carcinomas. *Veterinary Pathology*, 9 (6), 447–470.
- Misdorp, W. & Hart, A.A.M. (1976). Prognostic factors in canine mammary cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 56, 779-784.
- Misdorp, W. & Hart, A.A.M (1979). Canine mammary cancer. II. Therapy and causes of death. *J Small Anim Pract* 20, 395–404.
- Misdorp W. (1988) Canine Mammary Tumors: Protective Effect of Late Ovariectomy and Stimulating Effect of Progestins, *Veterinary Quarterly*, 10(1), 26-33.
- Misdorp, W., Else, R. W., Hellmén, E. & Lipscomb, T. P. (1999). Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. In *World Health Organization international histological classification of tumors of domestic animals* (2nd ed., Vol. VII).
- Misdorp W. (2002) Tumors of the mammary gland. In: Meuten D J (Ed) *Tumors in Domestic Animals*. pp 575-606. Iowa State Press, Ames, Iowa
- Modiano, J.F. & Breen, M. (2007). The Etiology of Cancer. In S.J. Withrow & E.G. MacEwen (Eds.), *Small animal clinical oncology* (4th Ed.). (pp. 3-39). Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Modiano, J.F. (2013). The Etiology of Cancer. In S.J. Withrow & E.G. MacEwen (Eds.), *Small animal clinical oncology* (5th Ed.). (pp. 1-13). Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Moe, L. (2001). Population-based incidence of mammary tumours in some dog breeds, *J Reprod Fertil Suppl* 57:439–443.
- Mol, J.A., Selman, P.J., Sprang, E.P., Van Neck, J.W., Oosterlaken-Dijksterhuis, M.A. (1997). The role of progestins, insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding proteins in the normal and neoplastic mammary gland of the bitch: a review. *Journal of Reproduction Fertility*, 51, 339-344.
- Mol, J.A., Lantinga-van Leeuwen, I.S. & van Garderen, E, et al: (1999). Mammary growth hormone and tumorigenesis—lessons from the dog, *Vet Q* 21:111–115.

- Moll, R., Franke, W.W. & Schiller, D L. (1982). The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, 31:11-24.
- Moll, R., Krepler, R., Frank, W.W. (1983). Complex cytokeratin polypeptide patterns observed in certain human carcinomas. *Differentiation*, 23:256-269.
- Moll, R., Divo, M. & Langbein, L. (2008). The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol* 129:705-733.
- Mook, S., Schmidt, M.K., Rutgers, E.J., van de Velde, A.O., Visser, O., Rutgers, S.M., Armstrong, N., van't Veer, L.J. & Ravdin, P.M. (2009). Calibration and discriminatory accuracy of prognosis calculation for breast cancer with the online Adjuvant! program: a hospital-based retrospective cohort study. *Lancet Oncol.* 10, 1070-1076.
- Morris, J.S., Dobson, J.M., Bostock, D.E, & O'Farrell, E. (1998). Effect of ovariohysterectomy in bitches with mammary neoplasms. *The Veterinary Record*, 142.656-658.
- Morris, J. (2001). Mammary gland. In J., Morris, J. Dobson (Eds.), *Small animal oncology*. Oxford: Blackwell Science.
- Moss, R.B., Moll, T. & El-Kalay, Kohne, C, Soo Woo, W., Encinas, J. & Carlo D.J. (2004) Th1/Th2 cells in inflammatory disease states: Therapeutic implications. *Expert Opin Biol Ther* 4:1887 – 1896.
- Moulton, J. (1990) Tumors of the mammary gland. In *Tumors in Domestic Animals*, pp. 518 – 552, University of California Press, Berkeley, Calif, USA, 3rd edition, 1990.
- Mouser, P., Miller, M.A., Antuofermo, E., Badve, S.S. & Mohammed, S.I. (2010). Prevalence and classification of spontaneous mammary intraepithelial lesions in dogs without clinical mammary disease. *Vet Pathol* 47, 275 – 284.
- Munk, M.E. & Emoto, M. (1995). Functions of T-cell subsets and cytokines in mycobacterial infections. *Eur Respir J Suppl*, 20:668s – 675s.
- Muto, T., Wakui, S., Takahashi, H., Maekawa, S., Masaoka, T. Ushigome, S. & Furusato M. (2000). *P53* gene mutations occurring in spontaneous benign and malignant mammary tumors of the dog. *Vet Pathol* 37: 248-253.
- Narod, S.A., Feunteun, J., Lynch, H.T., Watson, P., Conway, T, Lynch, T., Lynch, J. & Lenoir, G.M. (1991). Familial breast-ovarian cancer locus on chromosome 17q12-q23. *Lancet*. 338(8759):82-83.
- Nayyar, A. (2002). *Evaluation of Vinblastine and Mitomycin in conjugation with surgery in canine mammary neoplasms*. M. V. Sc Thesis, Punjab Agricultural University, Ludhiana.
- Nerurkar, V.R., Seshadri, R., Mulherkar, R., Ishwad, C.S., Lalitha, V.S. & Naik, S.N. (1987). Receptors for epidermal growth factor and estradiol in canine mammary tumors. *Int J Cancer* 40:230-232.

- Nicholas, K., Simpson, K., Wilson, M., Trott, J. & Shaw, D. (1997). The tammar wallaby: a model to study putative autocrine-induced changes in milk composition. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2:299-310.
- Nicholson, S., Wright, C., Sainsbury, J.R., Halcrow, P., Kelly, P., Angus B., Farndon, J.R. & Harris, A.L. (1990). Epidermal growth factor receptor (EGFr) as a marker for poor prognosis in node-negative breast cancer patients: neu and tamoxifen failure. *J Steroid Biochem Mol Biol* 37:811-814.
- Nielsen, T.O., Hsu, F.D., Jensen, K., Cheang, M., Karaca, G., Hu, Z., Hernandez-Boussard, T., Livasy, C., Cowan, D., Dressler, L., Akslen, L.A., Ragaz, J, Gown, A.M., Gilks, C.B., van de Rijn, M. & Perou, C.M. (2004). Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 10(16):5367-5374.
- 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. *Veterinary Pathology*, 37 (3), 239-47.
- Nieto, A., Perez-Alenza, M.D., Del Castillo, N., Tabanera, E., Castano, M. & Peña, L. (2003). BRCA1 expression in canine mammary dysplasias and tumours: relationship with prognostic variables, *J Comp Pathol* 128:260 – 268.
- Nishino, T., Ishibashi, K., Hirtreite, C & Nishino, Y. (2009). Potentiation of the antitumor effect of tamoxifen by combination with the antiprogesterin onapristone. *J Steroid Biochem Mol Biol* 116, 187–190.
- Norum, J., Andersen, K. & Sørli, T. (2014). Lessons learned from the intrinsic subtypes of breast cancer in the quest for precision therapy. *Br S Society* 101: 925–938.
- O'Hare, M.J., Ormerod, M.G., Monaghan, P., Lane, E.B. & Gusterson, B.A. (1991). Characterization *in vitro* of luminal and myoepithelial cells isolated from the human mammary gland by cell sorting. *Differentiation*, 46:209-221.
- O'Sullivan, C. & Lewis, C.E. (1994). Tumour-associated leucocytes: Friends or foes in breast carcinoma. *J Pathol*; 172:229– 235.
- Oftedal, O.T. (2002). The mammary gland and its origin during synapsid evolution. *Journal of Mammary Gland Biology Neoplasia* 2002, 7:225-252.
- Okoh, V., Deoraj, A. & Roy, D. (2011). Estrogen-induced reactive oxygen species-mediated signaling contribute to breast cancer, *Biochim Biophys Acta* 1815:115–133.
- ORPHEO GROUP (2014) *Translational Research on spontaneous animal models of breast cancer*, Nantes
- Otterbach, F., Bànkfalvi, À. Bergner, S., Decke, T., Krech, R. & Boecker W (2000). Cytokeratin 5/6 immunohistochemistry assists the differential diagnosis of atypical proliferations of the breast. *Histopathology*, 37:232-240.

- Owen, L.N. (1980). WHO, TNM classification of tumours in Domestic Animals. In: *Clinical Veterinary Oncology*. Editores - S.J. Withrow e E.G. MackEwen. J.B. Lippincott
- Palta, M. K. (2000). *Clinical studies on multimodality in the management of canine mammary neoplasm*. M.V.Sc. Thesis, Punjab Agricultural University, Ludhiana.
- Park, K., Han, S., Shin, E., Kim, H.J. & Kim, J.Y. (2007). EGFR gene and protein expression in breast cancers. *Eur J Surg Oncol* 33:956-960.
- Parker, H. G., Shearin, A. L., & Ostrander, E. A. (2010). Man's best friend becomes biology's best in show: genome analyses in the domestic dog. *Annual Review of Genetics*, 44,309–336.
- Parker, J.S., Mullins, M., Cheang, M.C., Leung, S., Voduc, D., Vickery, T., Davies, S., Fauron, C., He, X., Hu, Z., Quackenbush, J.F., Stijleman, I.J., Palazzo, J., Marron, J.S., Nobel, A.B., Mardis, E., Nielsen, T.O., Ellis, M.J., Perou, C.M. & Bernard, P.S. (2009). Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J. Clin. Oncol*, 27, 1160-1167.
- Patani, N., Martin, L. & Dowsett, M. (2013). Biomarkers for the clinical management of breast cancer: International perspective. *International Journal of Cancer*, 133, 1-13.
- Pathmanathan, N., Albertini, A.F., Provan, P.J., Milliken, J.S., Salisbury, E.L., Bilous, A.M. & Byth, K., Balleine, R.L. (2010). Diagnostic evaluation of papillary lesions of the breast on core biopsy. *Mod Pathol*, 23(7): 1021-1028.
- 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 (4), 228-234.
- Payne, S.J.L., Bowen, R.L., Jones, J. & Wells, C.A. (2008). Predictive markers in breast cancer – the present. *Histopathology*, 52:82 – 90.
- Peaker, M. (2002). The mammary gland in mammalian evolution: a brief commentary on some of the concepts. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 3, 347-353.
- Pearce, S.T. & Jordan, V.C. (2004). The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 50, 3-22.
- Péchoux, C., Gudjonsson, T., Rønnev-Jessen, L., Bissell, M.J. & Petersen, O.W. (1999). Human mammary luminal epithelial cells contain progenitors to myoepithelial cells. *Dev Biol*, 206:88-99.
- Peleteiro, M.C. & Correia, J.J. (1992). Diagnostic cytology of canine breast cancer. Hormonal receptors. *Medicina Veterinária*, 9 (número especial), 86-87.
- Peleteiro, M.C & Correia, J.J. (1993a). Classificação TNM dos tumores mamários de cadela e gata. *Medicina Veterinária*, 44, 47-50.
- Peleteiro, M.C & Correia, J.J. (1993b). O papel do patologista da abordagem clínica dos tumores mamários das fêmeas dos carnívoros domésticos. *Veterinária Técnica*, Fev, 28-33.

- Peleteiro, M.C. (1994). Tumores mamários na cadela e na gata. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, LXXXIX (509), 10-34.
- Peleteiro, C., Branco, S. & Correia, J. (1996). Estudo epidemiológico de tumores mamários em cadela. In C. Peleteiro, S. Branco & J. Correia, *Libro de Actas-VIII Reunion Sociedad Española de Anatomia Patológica Veterinária (SEAPV)*, p.66. Córdoba, Espanha.
- Peña, L.L., Nieto, A.I., Perez-Alenza, D., Cuesta, P. & Castano, M. (1998). Immunohistochemical detection of Ki-67 and Pcn1 in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 10, 237-246.
- Peña, L., de Andres, P.J., Clemente, M., Cuesta, P. & Perez-Alenza, M.D. (2013). Prognostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in a Prospective study with two-year follow-up: Relationship with clinical and histological characteristics. *Vet Pathol*, 50(1):94-105.
- Peña, L., Gama, A., Goldschmidt, M.H., Abadie, J., Benazzi, C., Castagnaro, M., Díez, L., Gartner, F., Héllmen, E., Kiupel, M., Millán, Y., Miller, M.A., Nguyen, F., Poli, A., Sarli, G., Zappulli, V. & de las Mulas, J.M. (2014) Canine mammary tumors: A review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. *Vet Pathol*, 51 (1):127-145.
- Pereira, C.T., Rahal, S.C., Baliero, J.C.C. & Ribeiro, A.A.C. (2003). Lymphatic drainage on healthy and neoplastic mammary glands in female dogs: Can it really be altered? *Anat Histol Embryol*, 32, 282-290.
- Perez-Alenza, M.D., Peña, L., Nieto, A.I. & Castano, M. (1997). Clinical and pathological prognostic factors in canine mammary tumors. *Ann Ist Super Sanita*, 33(4):581-585.
- Perez-Alenza, D., Rutteman, G.R., Peña, L., Beynen, A.C. & Cuesta, P. (1998) Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. *J Vet Intern Med* 12, 132 – 139.
- Pérez-Alenza, M.D., Peña, L., Del Castillo, N. & Nieto, A.I. (2000). Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumors. *Journal of Small Animal Practice*, 41, 287-291.
- Perez-Alenza M.D., Tabanera, E. & Peña, L. (2001). Inflammatory mammary carcinoma in dogs: 33 cases (1995–1999). *J Am Vet Med Assoc* 219:1110–1114.
- Perou, C.M., Sørli, T., Eisen, M.B., van de R. 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., Lønning, P.E., Børresen-Dale, A.L., Brown, P.O. & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406 (6797): 747-52.
- Philibert, J.C., Snyder, P.W., Glickman, N., Glickman, L., Knapp, D., Waters, D. (2003). Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17, 102 – 106.

- Pike, M.C., Spicer, D.V., Dahmouh, L. & Press, M.F. (1993) Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk, *Epidemiol Rev* 15:17–35.
- Pinho, S.S., Carvalho, S., Cabral, J., Reis, C.A. & Gartner, F. (2012). Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis. *Translational Research*, 159 (3), 165-172.
- Pinto, A.C., Ades, F., de Azambuja, E. & Piccart-Gebhart, M. (2013)_Trastuzumab for patients with HER2 positive breast cancer: Delivery, duration and combination therapies. *Breast*, 22 Suppl 2:S152-5.
- Poirier, V.J., Hershey, A.E., Burgess, K.E., Phillips, B., Turek, M.M., Forrest, L.J., Beaver, L. & Vail, D.M. (2004). Efficacy and toxicity of paclitaxel (Taxol) for the treatment of canine malignant tumors. *J Vet Intern Med* 18, 219–222.
- Prat, A., Cheang, M.C., Martin, M., Parker, J.S., Carrasco, E., Caballero R., Tyldesley, S., Gelmon, K., Bernard, P.S., Nielsen, T.O. & Perou, C.M. (2013) Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. *J Clin Oncol*, 31: 203–209.
- Prat, A., Bianchini, G., Thomas, M., Belousov, A., Cheang, M.C., Koehler, A., Gómez, P., Semiglazov, V, Eiermann, W., Tjulandin, S., Byakhov, M., Bermejo, B. & Zambetti, M. (2014) Research-based PAM50 subtype predictor identifies higher responses and improved survival outcomes in HER2-positive breast cancer in the NOAH study. *Clin Cancer Res*, 20: 511–521.
- Pusztai, L., Broglio, K., Andre, F., Symmans, W.F., Hess, K.R., Hortobagyi, G.N. (2008). Effect of molecular disease subsets on disease-free survival in randomized adjuvant chemotherapy trials for estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 4679–83.
- Quaresma, A.M.G.G. (2008) *Canine mammary gland tumours: New insights into prognosis and molecular classification*. PH.D Thesis. Vila Real: Departamento de Ciências Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto-Douro.
- Queiroga, F. & Lopes, C. (2002). Tumores mamários caninos – novas perspectivas. *Congresso de Ciências Veterinárias, Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias, Oeiras*, 183-190.
- Queiroga, F.L., Pérez-Alenza, M.D., Silvan, G., Peña, L., Lopes, C. & Illera, J.C. (2005). Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. *Journal Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 94 (1-3), 181-7.
- Queiroga, F., Alves, A., Pires, I. & Lopes, C. (2007) Expression of Cox-1 and Cox-2 in canine mammary tumours. *J. Comp. Path*,136,177-185.
- Queiroga, F.L., Perez-Alenza, M.D., Silvan, G., Peña, L., Lopes, C.S. & Illera, J.C. (2008). Crosstalk between GH/IGF-I axis and steroid hormones (progesterone, 17betaestradiol) in canine mammary tumours. *Journal Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 110, 76-82.

- Queiroga, F.L., Perez-Alenza, D., Silvan, G., Peña, L., Lopes, C.S. & Illera, J.C. (2010a). Serum and intratumoural GH and IGFI concentrations: Prognostic factors in the outcome of canine mammary cancer. *Research Veterinary Science*, 89, 396-403.
- Queiroga, F.L., Pires, I., Lobo, L. & Lopes, C.S. (2010b). The role of Cox-2 expression in the prognosis of dogs with malignant mammary tumours. *Research Veterinary Science*, 88 (3), 441-445.
- Queiroga, F., Raposo, T., Carvalho, M., Prada, J. & Pires, I. (2011). Canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: most recent findings. *In Vivo*, 25, 455-466.
- Ramalho, R.N., Ribeiro-Silva, A. Cassali, G.D. & Zucoloto, S. (2006). The Expression of p63 and Cytokeratin 5 in Mixed Tumors of the Canine Mammary Gland Provides New Insights into the Histogenesis of These Neoplasms. *Vet Pathol*, 43(4): 424-429.
- Rampaul, R.S., Pinder, S.E., Nicholson, R.I., Gullick, W.J., Robertson, J.F. & Ellis IO. (2005). Clinical value of epidermal growth factor receptor expression in primary breast cancer. *Adv Anat Pathol*, 12:271 – 273.
- Rayter, Z. & Mansi, J. (2008). *Medical Therapy of Breast Cancer* (1st Ed.) Cambridge: Cambridge University Press. Excerpto disponível em http://assets.cambridge.org/97805214/96322/excerpt/9780521496322_excerpt.pdf
- Reis-Filho, J.S., Milanezi, F., Carvalho, S., Simpson, P.T., Steele, D., Savage, K., Lambros, M.B., Pereira, E.M., Nesland, J.M., Lakhani, S.R. & Schmitt FC. (2005). Metaplastic breast carcinomas exhibit EGFR, but not HER2, gene amplification and overexpression: immunohistochemical and chromogenic *in situ* hybridization analysis. *Breast Cancer Res* 7:RA1028-1035.
- Reis-Filho, J.S., Simpson, P.T., Turner, N.C., Lambros, M.B., Jones, C., Mackay, A., Grigoriadis, A., Sarrio, D., Savage, K., Dexter, T., Irvani, M., Fenwick, K., Weber, B., Hardisson, D., Schmitt, F.C., Palacios, J., Lakhani, S.R. & Ashworth, A. (2006). FGFR1 emerges as a potential therapeutic target for lobular breast carcinomas. *Clin Cancer Res.*, 15;12 (22):6652-62.
- Reis-Filho, J.S., Weigelt, B. & Fumagalli, D. & Sotiriou, C. (2010). Molecular profiling: moving away from tumor philately. *Sci Transl Med* 2010; 2, 47ps43.
- Reis-Filho, J.S. & Pusztai, L. (2011). Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. *Lancet*, 19; 378(9805): 1812-23.
- Ressel, L., Puleio, R., Loria, G., 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. *Res Vet Sci*, 94 299-305.
- Révillion, F., Bonnetterre, J. & Peyrat, J.P. (1998). ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance. *Eur J Cancer*. 34(6):791-808.
- Rezia, A., Tavasoli, A., Bahonar, A., & Mehrazma, M. (2009). Grading in canine mammary gland carcinoma. *Journal of Biological Sciences*, 9: 333-38.

- Richards, H.G, McNeil, P.E., Thompson, H. & Reid, S.W. (2001). An epidemiological analysis of a canine-biopsies database compiled by a diagnostic histopathology service. *Preventive Veterinary Medicine*, 51 (1-2), 125 – 136.
- Ripoll, G.V., Giron, S., Krzymuski, M.J., Hermo, G.A., Gomez, D.E & Alonso DF. (2008). Antitumor effects of desmopressin in combination with chemotherapeutic agents in a mouse model of breast cancer. *Anticancer Res.*, 28 (5A):2607-11.
- 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.
- Rivera, P. & von Euler, H. (2011). Molecular biological aspects on canine and human mammary tumors. *Veterinary Pathology* 48, 132 – 146.
- Romond, E.H., Perez, E.A., Bryant, J., Suman, V.J., Geyer, C.E. Jr., Davidson, N.E., Tan-Chiu, E., Martino, S., Paik, S., Kaufman, P.A., Swain, S.M., Pisansky, T.M., Fehrenbacher, L., Kutteh, L.A., Vogel VG, Visscher DW, Yothers G, Jenkins RB, Brown AM, Dakhil SR, Mamounas EP, Lingle WL, Klein PM, Ingle, J.N. & Wolmark, N. (2005) Trastuzumab plus Adjuvant Chemotherapy for Operable HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med*. 353(16): 1673-84.
- Roskoski, R. (2014). The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol. Res.*, 79, 34-74.
- Rouzier, R., Perou, C.M., Symmans, W.F., Ibrahim, N., Cristofanilli, M., Anderson, K., Hess, K.R., Stec, J., Ayers, M., Wagner, P., Morandi, P., Fan, C., Rabiul, I., Ross, J.S., Hortobagyi, G.N., Pusztai, L., (2005). Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* 11, 5678e5685.
- Rungsiapat, 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. *Journal of Veterinary Medical Science*, 61, 27-32.
- Rutteman, G., Misdorp, M., Blankestijn, M., & van den Brom, W. (1988). Oestrogen (ER) and progesterin receptors (PR) in mammary tissue of female dog: different receptor profile in non-malignant and malignant states. *Br. J. Cancer*, 58, 594-599.
- Rutteman, G.R., Withrow, S.J. & MacEwen, E.G. (2001). Tumors of the mammary gland. In S.J. Withrow & E.G. MacEwen (Eds.), *Small animal clinical oncology* (3rd ed.). (pp.455-477). Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Saba, C.F., Rogers K.S., Newman S.J., Mauldin G.E., Vail D.M. (2007) Mammary gland tumors in male dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21(5): 1056-9.
- Saeki, K., Endo, Y., Uchida, K., Nishimura, R., Sasaki, N., Nakagawa, T. (2012) Significance of tumor-infiltrating immune cells in spontaneous canine mammary gland tumor: 140 cases. *Journal of Veterinary Medical Science*, 74: 227– 230.

- Salomon, F.V, Geyer, H., Gille, U., (2008). Milchdruse, Mamma. Anatomie für die Tiermedizin, 2nd edn. Enke, Stuttgart, pp.645–655.
- Sangha, S., Singh, A., Sood, N. & Gupta, K. (2011). Specificity and sensitivity of cytological techniques for rapid diagnosis of neoplastic and non-neoplastic lesions of canine mammary gland. *Braz J Vet Pathol*, 2011, 4 (1), 13-22.
- Santini, D., Ceccarelli, C., Tardio, M.L., Taffurelli, M. & Marrano, D. (2002). Immunocytochemical expression of epidermal growth factor receptor in myoepithelial cells of the breast. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology*, 10: 29-33.
- Santos, A.A., Oliveira, J.T., Lopes, C.C., Amorim, I., Vicente, C., Gartner, F. & Matos, A. (2010). Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology*, 143: 268–275.
- Santos, A., Lopes C., Marques, R.M., Amorim, I., Ribeiro, J., Frias, C., Vicente, C., Gärtner, F. & de Matos, A. (2011). Immunohistochemical analysis of urokinase plasminogen activator and its prognostic value in canine mammary tumours. *Veterinary Journal*, 189: 43–48.
- Santos, A. A., Lopes, C.C., Ribeiro, J. R., Martins, L.R., Santos, J. C., Amorim, I. F., Gärtner, F. & Matos, A. J. (2013). Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. *BMC Veterinary Research*, 9:1-11.
- Santos, M., Correia-Gomes, C., Marcos, R., Santos, A., de Matos, A., Lopes, C. & Dias-Pereira, P. (2015). Value of the Nottingham Histological Grading parameters and Nottingham Prognostic Index in canine mammary carcinoma. *Anticancer Research*, 35: 4219-4228
- Sarli, G., Preziosi, R., Benazzi, C., Castellani, G. & Marcato, P.S. (2002). Prognostic value of histologic stage and proliferative activity in canine malignant mammary tumors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 14: 25-34.
- Sartin, E., Barnes, S., Kwapien, R. & Wolfe, L. (1992). Estrogen and progesterone receptor status of mammary carcinomas and correlation with clinical outcome in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 53: 2196-200.
- Sassi, F., Sarli, G., Brunetti, B., Morandi, F. & Benazzi, C. (2008). Immunohistochemical characterization of mammary squamous cell carcinoma of the dog. *J Vet Diagn Invest.* 20(6):766-73.
- Sassi, F., Benazzi, C., Castellani, G. & Sarli, G. (2010). Molecular-based tumor subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. *BMC Veterinary Research*, 6: 5-13.
- Schmidt, M., Victor, A., Bratzel, D., Boehm, D., Cotarelo, C., Lebrecht, A., Siggelkow, W., Hengstler, J.G., Elsasser, A., Gehrmann, M., Lehr, Ha., Koelbl, H., von Minckwitz, G., Harbeck, N., Thomssen, C. (2009). Long-term outcome prediction by clinicopathological risk classification algorithms in node-negative breast cancer - comparison between Adjuvant!, St Gallen, and a novel risk algorithm used in the prospective randomized Node-Negative-Breast Cancer-3 (NNBC-3) trial. *Ann Oncol*, 20: 258-264.

- 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.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S. & Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9: 671-675.
- Scholzen, T., & Gerdes, J. (2000). The ki-67 protein: from the known and the unknown. *J CellPhysiol*, 182(3):311-322.
- Selman, P., Mol J., Rutteman, G., van Garderen, E. & Rijnberk, A. (1994). Progestin-induced growth hormone excess in the dog originates in the mammary gland. *Endocrinology*, 134: 287–292.
- Sennazli, G., Yildirim, F., Sonmez, K., Arun, S. & Gurel, A. (2015). Immunopathologic evaluation of estrogen receptor, progesterone receptor, and Ki67 antibody expressions in canine mammary tumours. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 10: 1-8.
- Sestak, I., Dowsett, M., Zabaglo, L., Lopez-Knowles, E., Ferree, S., Cowens, J.W. & Cuzik, J. (2013). Factors predicting late recurrence for estrogen receptor-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 105: 1504– 1511.
- Sharma, H. (2003). *Studies on presurgical use of mitomycin and vinblastine in canine mammary neoplasms*. M.V. Sc. Thesis, Punjab Agricultural University, Ludhiana.
- Shivani (2007) *Cytopathology of canine mammary gland affections with special reference to mammary gland tumors*. M. V. Sc Thesis, GADVASU, Ludhiana, India.
- Shivani, S., Singh, A.; Sood, N & Gupta, K. (2011). Specificity and sensitivity of cytological techniques for rapid diagnosis of neoplastic and non-neoplastic lesions of canine mammary gland. *Braz J Vet Pathol*, 4(1): 13-22.
- 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.
- 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.
- Sirri, V., Roussel, P. & Hernandez-Verdun, D. (2000). The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. *Micron*, 31: 121-126.
- Sittner, G. (1939). Mammamisch tumor bei einem männlichen Hund und seine Histogenese. *Archiv für Wissenschaftliche und Praktische Tierheilkunde*, 74, 406–410.
- Slamon, D., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J. & Norton, L. (2001). Use of

chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*, 344,783-792

- Sleeckx, N., de Rooster, H., Kroeze, E., Van Ginneken, C., & Van Brantegem, L. (2011). Canine Mammary Tumours, an Overview. *Reprod Dom Anim*, 10: 1-20.
- Smith, I., Procter, M., Gelber, R., Guillaume, S., Feyereislova, A., Dowsett, M., Goldhirsch, A., Untch, M., Mariani, G., Baselga, J., Kaufmann, M., Cameron, D., Bell, R., Bergh, J., Coleman, R., Wardley, A., Harbeck, N., Lopez, R., Mallmann, P., Gelmon, K., Wilcken, N., Wist, E., Sánchez, & Rovira, P. (2007). 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet*, 369(9555), 29-36
- Snead, D., Bell, A., Dixon, A., Nicholson, R., Elston, C., Blamey, R., & Ellis, O. (1993). Methodology of immunohistological detection of estrogen receptor in human breast carcinoma in formalin-fixed paraffin- embedded tissue: a comparison with frozen section methodology. *Histopathology*, Vol. 23, No. 3, 1993, pp. 233-238.
- Sobczak-Filipiak, M., & Malicka, E. (2002). Estrogen receptors in canine mammary gland tumours. *Pol J Vet Sci*, 5:1-5
- Sobin, L., Wittekind, C. (1997). TNM classification of malignant tumors. Eds. New York: Wiley-Liss.
- Solano-Gallego, L. (2010). Reproductive system. In R.E. Raskin, D.J. Meyer (Eds.), Canine and feline cytology. A color atlas and interpretation guide. (pp. 274-282). Missouri, UK: Saunders Elsevier.
- Sonnenschein, E., Glickman, L., Goldschmidt, M. & McKee, L., (1991). Body conformation, diet, and risk of breast cancer in pet dogs: a case-control study. *Am J Epidemiol*, 133: 694-703.
- 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(3), 266-70.
- Sorenmo, K. (2003). Canine mammary gland tumors. *Vet Clin North Am*, 33, 573-596.
- Sorenmo, K.U., Kristiansen, V.M., Cofone, M.A., Shofer, F.S., Breen, A.M., Langeland, M., Mongil, C.M., Grondahl, A.M., Teije, J. & Goldschmidt, M.H. (2009). Canine mammary gland tumours: a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Vet Comp Oncol*, 7, 162-172.
- 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 S.J. Withrow, Vail, D.M., Page, R.L. Small animal clinical oncology (5th Ed) Missouri: Elsevier Saunders.

- Sørli, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rinjn, M., Jeffrey, S.S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J.C., Brown, P.O., Botstein, D., Lønning, P.E., Børresen-Dale, A.L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 11; 98 (19):10869-74.
- Sorlie, 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., Lonning, P.E., Brown, P.O., Borresen-Dale, A.L. & Botstein, D., (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 8418e8423.
- Sotiriou, C., Neo, S., McShane, L., Korn, E., Long, P., Jazaeri, A., Martiat, P., Fox, S.B., Harris, A.L. & Liu, E.T.(2003). Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population- based study. *Proc Natl Acad Sci*, 100: 10393-10398.
- Staa, J. & Ringnér, M. (2015). Making Breast Cancer Molecular Subtypes Robust? *JNCI J Natl Cancer Inst*, 107:1–2
- Stovring, M. Moe, M. & Glatre, E. (1997). A population based case-control study of canine mammary tumors and clinical use of medroxyprogesterone acetate. *Acta Pathologica Microbiologica Immunologica Scandnavica* 105, 590-596.
- Stratmann, N., Failing, K., Richter, A. & Wehrend, A. (2008). Mammary tumor recurrence in bitches after regional mastectomy. *Vet Surg* 37, 82 – 86.
- Stuart-Harris, R. & Davis, A. (2010). Optimal adjuvant endocrine therapy for early breast cancer. *Womens Health (Lond Engl)* 6, 383–398.
- Szabo S., Haislip, A.M. & Garry, R.F. (2005). Of Mice, Cats, and Men: Is Human Breast Cancer a Zoonosis? *Microscopic Research and Technique*, 68, 197-208.
- Szczubial, M. & Lopuszynski, W. (2011). Prognostic value of regional lymph node status in canine mammary carcinomas. *Vet Comp Oncol*, 9(4):296-303.
- Tahan, S.R., Neuberger, D.S., Dieffenbach, A. & Yacoub, L. (1993), Prediction of early relapse and shortened survival in patients with breast cancer by proliferating cell nuclear antigen score. *Cancer* 71,3552 – 3559.
- Tan, T.T. & Coussens, L.M. (2007) Humoral immunity, inflammation and cancer. *Curr Opin Immunol*,19:209 – 216.
- Tao, L., Gomez, S.L., Keegan, T.H., Kurian, A.W., Clarke, C.A (2015). Breast Cancer Mortality in African-American and Non-Hispanic White Women by Molecular Subtype and Stage at Diagnosis: A Population-Based Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers*, 24(7):1039-45.
- Tavares, W.L.F., Lavalle, G.E., Figueiredo, M.S., Souza, A.G., Bertagnolli, A.C., Viana, F.A.B., Paes, P.R.O., Carneiro, R.A., Cavalcanti, G.A.O., Melo, M.M. & Cassali, G.D. (2010). Evaluation of adverse effects in tamoxifen exposed healthy female dogs; *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52-67.

- Terraube, V., Pendu, R., Baruch, D., Gebbink, M.F., Meyer, D. Lenting, P.J. & Denis, C.V. (2006) Increased metastatic potential of tumor cells in von Willebrand factor deficient mice. *J Thromb Haemost.*; 4(3):519-26.
- Thakkar, J. & Mehta, D. (2011) A review of an unfavorable subset of breast cancer estrogen receptor positive progesterone receptor negative. *The Oncologist-Breast Cancer*, 16, 276-285.
- Thomas, M., Noguchi, M. & Kitagawa, H. (1993) Poor prognostic value of proliferating cell nuclear antigen labelling index in breast carcinoma. *J Clin Pathol* 46:525–528.
- Thuroczy, J., Reisvaag, G.J., Perge, E., Tibold, A., Szilagy, J. & Balogh, L. (2007) Immunohistochemical detection of progesterone and cellular proliferation in canine mammary tumours. *J Comp Pathol*, 137, 122–129.
- Toi, M., Tominaga, T., Osaki, A. & Toge, T. (1994). Role of epidermal growth factor receptor expression in primary breast cancer: results of a biochemical study and an immunocytochemical study. *Breast Cancer Res Treat* 29:51-58.
- Tovey, S.M., Witton, C.J., Bartlett, J.M.S., Stanton, P.D., Reeves, J.R. & Cooke, T.G. (2004). Outcome and human epidermal growth factor receptor (HER) 1-4 status in invasive breast carcinomas with proliferation indices evaluated by bromodeoxyuridine labelling. *Breast Cancer Res* 6:246 – 251.
- Toyoshima, K. (1990). Proto-oncogene C erbB-2 and human cancer. *Gan To Kagaku Ryoho*. 17(3 Pt 1):309-14.
- Tsutsui, S., Ohno, S., Murakami, S., Hachitanda, Y. & Oda, S. (2002). Prognostic value of epidermal growth factor receptor (EGFR) and its relationship to the estrogen receptor status in 1029 patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 71:67-75.
- Turner, N.C., Reis-Filho, J.S., Russell, A.M., Springall, R.J., Ryder, K., Steele, D., Savage, K., Gillett, C.E., Schmitt, F.C., Ashworth, A. & Tutt, A.N. (2007). BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. *Oncogene* 26, 2126-2132.
- Untch, M., Gerber, B., Harbeck, N., Jackisch, C., Marschner, N., Möbus, V., von Minckwitz, G. & Loibl, S. (2013) 13th St. Gallen International Breast Cancer Conference 2013: Primary Therapy of Early Breast Cancer Evidence, Controversies, Consensus – Opinion of a German Team of Experts (Zurich 2013) Consensus · Konsens Breast Care;8:221–229.
- Vail, D. M. & MacEwen, E. G. (2000). Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer, *Cancer Investigation*, 18 (8), 781–792.
- van de Rijn, M., Perou, C.M., Tibshirani, R., Haas, P., Kallioniemi, O., Kononen, J., Torhorst, J., Sauter, G., Zuber, M., Kochli, O.R., Mross, F., Dieterich, H., Seitz, R., Ross, D., Botstein, D. & Brown, P. (2002) Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *Am J Pathol* 161, 1991–1996.
- van't Veer, L.J., Dai, H., van de Vijver, M.J., He, Y.D., Hart, A.A., Mao, M., Peterse, H.L., van der Kooy, K., Marton, M.J., Witteveen, A.T., Schreiber, G.J., Kerkhoven, R.M.,

- Roberts, C., Linsley, P.S., Bernards, R. & Friend, S.H. (2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415:530–536.
- Velculescu, V.E. & El-Deiry, W.S. (1996) Biological and clinical importance of the *p53* tumor suppressor gene. *Clin Chem* 42: 858-868.
- Veronese, S.M., Gambacorta, M. & Gottardi, O. (1993) Proliferation index as a prognostic marker in breast cancer. *Cancer* 71:3926–3931.
- Vielh, P., Chevillard, S., Mosseri, V. et al.: 1990, Ki-67 index and S-phase fraction in human breast carcinomas. Comparison and correlations with prognostic factors. *Am J Clin Pathol* 94:681– 686.
- Villalobos, A. (2007). *Canine and Feline Geriatric Oncology*. Ames. Blackwell Publishing. 1st edition: 89-102.
- Vonholdt, B, Pollinger, J., Lohmueller K., Han, E., Heidi, G. & Quignon, P. (2010). Genome-wide SNP and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication. *Nature*, 464, 7290: 898–902.
- Wakui, S., Muto, T., Yokoo, K., Yokoo, R., Takahashi, H., Masaoka, T., Hano, H., Furusato, M. (2001). Prognostic status of *p53* gene mutations in canine mammary carcinoma. *Anticancer Research*, 21, 611-616.
- Wang, C., Fu, M., Angeletti, R.H., Siconolfi-Baez, L., Reutens, A.T., Albanese, C., Lisanti, M.P., Katzenellenbogen, B.S., Kato, S., Hopp, T., Fuqua, S.A., Lopez, G.N., Kushner, P.J. & Pestell, R.G. (2001). Direct acetylation of the estrogen receptor alpha hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity..*J Biol Chem.*, 276 (21), 18375 – 83.
- Watson, C. J. & Khaled, W. (2008). Mammary development in the embryo and adult: a journey of morphogenesis and commitment. *Development*, 135, 995-1003.
- Wayne, R. & Vonholdt, B. (2012). Evolutionary genomics of dog domestication. *Mammalian Genome*, 23, 1-2: 3–18.
- Weigelt, B. & Reis-Filho, J.S. (2009). Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 6, 718-730.
- Weigelt, B., Baehner, F. L. & Reis-Filho, J. S. (2010a). The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. *The Journal of Pathology*, 220: 263–280.
- Weigelt, B., Geyer, F. C., & Reis-Filho, J. S. (2010b). Histological types of breast cancer: how special are they? *Molecular Oncology*, 4 (3), 192–208.
- Wintzer, H.O., Zipfel, I. & Schulte-Monting, J., (1991) Ki-67 immunostaining in human breast tumors and its relationship to prognosis. *Cancer* 67:421 – 428.
- Wolff, A.C., Hammond, M.E., Schwartz, J.N., Hagerty, K.L., Allred, D.C., Cote, R.J., Dowsett, M., Fitzgibbons, P.L., Hanna, W.M., Langer, A., McShane, L.M., Paik, S., Pegram, M.D., Perez, E.A., Press, M.F., Rhodes, A., Sturgeon, C., Taube, S.E., Tubbs, R., Vance, G.H., van de Vijver, M., Wheeler, T.M., Hayes, D.F. & American Society of Clinical

- Oncology/College of American Pathologists (2007). American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*, 131 (1), 18-43.
- 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.
- Yamaguchi, Y. (2007). Microenvironmental regulation of estrogen signals in breast cancer. *Breast Cancer*, 14, 175-181.
- Yang, W.Y., Liu, C.H., Chang, C.J., Lee, C.C., Chang, K.J. & Lin, C.T. (2006) Proliferative activity, apoptosis and expression of oestrogen receptor and Bcl 2 oncoprotein in canine mammary tumours. *J Comp Pathol*, 134, 70-79.
- Yarden, Y. (2001) The EGFR family and its ligands in human cancer. Signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer. Sep;37 Suppl 4:S3-8*.
- Yoshikawa Y., Morimatsu, M., Ochiai K., Ishiguro-Oonuma, T., Wada, S., Orino, K. & Watanabe, K. (2015) Reduced canine BRCA2 expression levels in mammary gland tumors. *BMC Veterinary Research*, 11:159
- Zacchetti, A., van Garderen, E. & Rutteman, G.R. (2007) Immunohistochemical evaluation of p53 expression with different antibodies in malignant canine tumours with or without p53 gene mutation. *Vet Comp Oncol*. 5(2):108-118.
- Zhang, H., Somasundaram, K. & Peng, Y. (1998). BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity. *Oncogene*. 16(13):1713-1721.
- Zivadinovic, D., Gametchu, B. & Watson, C.S. (2005). Membrane estrogen receptor-alpha levels in MCF-7 breast cancer cells predict cAMP and proliferation responses. *Breast Cancer Res*. 7 (1), R101–12.
- Zuccari, D.A.P.C., Santana, A.E. & Rocha N.E. (2001). Correlação entre a citologia aspirativa por agulha fina e a histologia no diagnóstico de tumores mamários de cadelas. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 38 (1) 38-41.
- Zuccari, D., Pavam, M., Cordeiro, J. & Santana, A. (2004) A imuno-expressão das citoqueratinas como marcadores diagnósticos e prognósticos nas neoplasias mamárias caninas. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 99 (551) 173-178.
- Zuccari, D., Pavam, M., Terzian, A., Pereira, R., Ruiz, C. & Andrade, J. (2008) Immunohistochemical evaluation of e-cadherin, Ki-67 and PCNA in canine mammary neoplasias: Correlation of prognostic factors and clinical outcome. *Pesq. Vet. Bras*. 28(4):207-215.

Capítulo IX – Anexos

Anexo A – Inquérito entregue a clínicas e hospitais veterinários que se disponibilizaram para a recolha e entrega de amostras tumorais mamárias e amostras de sangue.

(Excluindo o Hospital Veterinário Escolar da FMV, onde o acesso a todas as informações era irrestrito e dependente da consulta da aluna.)

Caso	
Nome da clínica/hospital	
Nome do animal	
Nome do dono	
Conhecimento/consentimento estudo pelo dono	
Contacto do dono	
Data de nascimento	
Raça	
Peso	
Tratamento preventivo de estro	
Esterilizada? (quando?)	
Antecedentes médicos/cirúrgicos	
É primeiro diagnóstico de neoplasia?	
É primeiro diagnóstico de patologia mamária?	
Altura de aparecimento/deteção da massa	
Fez raio-X tórax?	
Evidência de metástase pulmonar?	
Suspeita de outra metástase por outro meio de diagnóstico?	
Número de massas mamárias	
Localização da(s) massa(s)	
Tipo de cirurgia	
Extirpação de todas as massas detetadas?	
Recolha de linfonodos?	
Ulceração?	
Inflamação?	
Aderência ao músculo?	
Data de colheita pré-cirúrgica de sangue	
Data de cirurgia	

Anexo B – Base protocolar das técnicas de imunohistoquímica realizadas com resultados satisfatórios.

As técnicas de imunohistoquímica foram realizadas através do método do polímero indireto, utilizando o *Kit Novocastra™ Novolink™ Max Polymer Detection System (Leica Biosystems)*, tendo sido dele utilizados a solução de recuperação de antigénio (solução RE7119 Tris/EDTA com surfactante pH 9.0 concentrado 10x, diluição 1:10), a solução de bloqueio de proteínas (*protein block*), a de bloqueio da peroxidase endógena (*peroxidase block*), o ativador da penetração do polímero (*post primary block*), o polímero (*Novolink Polymer*), o cromogénio (*Diaminobenzidine chromogen*) e o respetivo substrato (*DAB substrate buffer*). Para a diluição do anticorpo primário foi utilizada a solução de diluição de anticorpos (*Novocastra Bond Primary Antibody Diluent*).

Além destes, foram usadas ainda as seguintes soluções, preparadas em laboratório aquando da realização das IHQs, com reagentes pertencentes ao Laboratório de Anatomia Patológica da FMV, e de acordo com as formulações comumente usadas no laboratório:

1. Solução de recuperação de antigénio: tampão citrato (0.01M NaCH₃COO, pH 6.0).
2. Tampão de lavagem: PBS (*Phosphate buffered saline*)
3. Reagente de Bloqueio da Peroxidase - Solução H₂O₂ a 3% (em substituição à solução supracitada de bloqueio da peroxidase endógena)
4. Solução TBS (*Tris buffered saline*), pH 7.4

1- Desparafinação e reidratação dos cortes:

Todos os protocolos se iniciaram com a desparafinação dos cortes em xilol seguindo-se a reidratação através da passagem por álcoois em concentrações decrescentes (etanol a 100%, 95% e 70%) e a lavagem em água destilada ou desionizada.

- Colocação das lâminas em xilol – 15 min (±1min).
- Colocação das lâminas em novo xilol – 10 min (±1min).
- Desperdício do excesso de líquido e colocação das lâminas em etanol a 100% - 6min (±1min).
- Desperdício do excesso de líquido e colocação das lâminas em etanol a 95% - 6min (±1min).
- Colocação das lâminas em etanol a 70% - 6min (±1min).
- Desperdício do excesso de líquido e colocação das lâminas em água desionizada ou destilada - 5 min.

2- Recuperação antigénica

- a) Panela de pressão: submersão dos cortes em solução tampão à pressão de 2 atmosferas, durante 2 minutos, seguida de arrefecimento lento por 20 a 30 minutos.
- b) Banho-maria: submersão dos cortes em solução tampão à temperatura de 95-99°C, durante 1 hora, seguida de arrefecimento lento por 20 a 30 minutos.

- c) Micro-ondas: submersão dos cortes em solução tampão à ação de micro-ondas, a potências e tempos variáveis, seguida de arrefecimento lento por 20 a 30 minutos.
- 3- Lavagem** por esguicho e submersão das lâminas em solução de lavagem adequada duas vezes, por períodos de 5 minutos.
 - 4- Bloqueio de proteínas inespecíficas** (por períodos de tempo de acordo com as especificações constantes na Tabela3).
 - 5- Lavagem** por esguicho e submersão das lâminas em solução de lavagem adequada duas vezes, por períodos de 5 minutos.
 - 6- Incubação com anticorpo primário** (a concentrações e períodos de incubação de acordo com as especificações constantes na Tabela4).
 - 7- Lavagem** por esguicho e submersão das lâminas em solução de lavagem adequada duas vezes, por períodos de 5 minutos.
 - 8- Bloqueio da peroxidase** (8 minutos)
 - 9- Lavagem** por esguicho e submersão das lâminas em solução de lavagem adequada duas vezes, por períodos de 5 minutos.
 - 10- Bloqueio de pós-primário (30 min)**
 - 11- Lavagem** por esguicho e submersão das lâminas em solução de lavagem adequada duas vezes, por períodos de 5 minutos.
 - 12- Aplicação de anticorpo secundário/polímero (30 min)**
 - 13- Lavagem** por esguicho e submersão das lâminas em solução de lavagem adequada duas vezes, por períodos de 5 minutos.
 - 14- Aplicação de cromogénio e respetivo substrato (8 min)**
 - 15- Lavagem com água destilada por esguicho e submersão**
 - 16- Coloração com hematoxilina de Mayer** (Novocasta™ Novolink™ Max Polymer Detection System, Leica Biosystems)
 - 17- Lavagem com água corrente**
 - 18- Desidratação (passos inversos aos descritos no primeiro ponto) e montagem** (Entelan, Quick-D Mounting Medium, Klinipath, Holanda).

Anexo C – Protocolos utilizados na tentativa de detecção da imunexpressão para RE nas instalações da FMV.

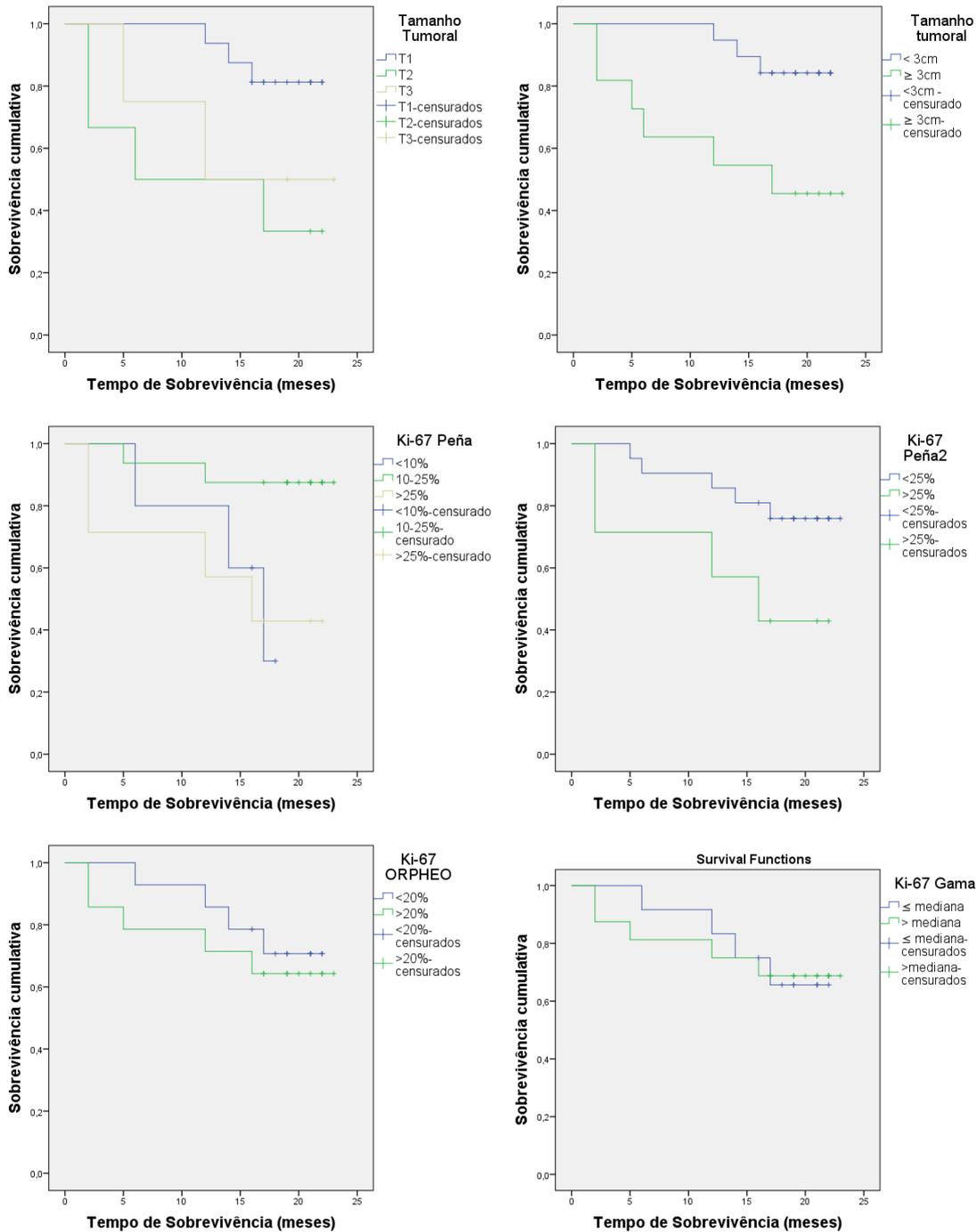
Protocolo	Tecido testado	Anticorpo primário (clone)	Diluição	Solução de recuperação do antígeno e pH	Método de recuperação do antígeno	Tempos	Solução de lavagem	Resultado em amostras	Resultado no controle (útero de gata/ carcinoma mamário de mulher positivos a RE)
1	mama de cadela	6F11	1:100	citrato 6.2	Panela de pressão	-	PBS	Negativo	Positivo
2	mama de cadela	6F11	1:50	citrato 6.2	Panela de pressão	-	PBS	Negativo	Positivo
3	mama de cadela	6F11	1:50	citrato 7.6	Micro-ondas	3,5 min a 750w, 5 min 200w, 5 min 200w	PBS	Negativo	Negativo
4	mama de cadela	SP1	1:50	citrato 7.6	Panela de pressão	-	PBS	Negativo	Negativo
5	mama de cadela	6F11	1:50	citrato 6.12	Micro-ondas	15 min 750w	PBS	Negativo	Negativo
6	mama de cadela	6F11	1:50	citrato 6.12	Micro-ondas	15 min 750w	TBS	Negativo	Positivo
7	mama de cadela	6F11	1:50	EDTA	Micro-ondas	15 min 750w	PBS	Negativo	Positivo
8	mama de cadela	6F11	1:50	citrato 7.73	Micro-ondas	15 min 750w	PBS	Negativo	Positivo
9	útero de cadela	6F11	1:50	EDTA	Micro-ondas	15 min 750w	PBS	Negativo	Negativo
10	útero de cadela	6F11	1:50	citrato 7.73	Micro-ondas	15 min 750w	PBS	Negativo	Negativo
11	útero de cadela	6F11	1:50	citrato 6.0	Panela de pressão	-	PBS	Negativo	Negativo
12	mama de cadela	6F11	1:50	10Mm citrato	Micro-ondas	15 min 750w	TRIS (PH 7.4)	Negativo	Positivo

Anexo D – Descrição do protocolo usado pela equipa da Prof.^a Dra. Renée L. Amorim (Unesp, Brasil) na realização de IHQ para deteção da imunexpressão para RE.

- 1- Recuperação antigénica:** em câmara de pressão controlada (Pascal[®]/Dako, EUA) com tampão citrato 10mM, pH 6.0.
- 2- Bloqueio da peroxidase** (20 minutos) *Peroxidase block – Spring, Protein Block (Spring Bioscience)*
- 3- Lavagem** com solução tampão TRIS pH 7.4 (10 lavagens)
- 4- Bloqueio de proteínas** (30 minutos) *Protein Block, Serum-Free, Dako*
- 5- Remoção de excesso de tampão** (mecanicamente, sem lavagem)
- 6- Incubação com anticorpo primário** *anti-RE (Dako Cytomation, usando diluidor Antibody Diluent, Background Reducing, Dako)*
- 7- Lavagem** com solução tampão TRIS pH 7.4 (10 lavagens)
- 8- Aplicação** de anticorpo secundário/polímero (*Envision, Dako*)
- 9- Lavagem** com solução tampão TRIS pH 7.4 (10 lavagens)
- 10- Aplicação de cromogénio DAB** (*Diaminobenzidine chromogen – Dako*) e substrato (8 min)
- 11- Lavagem com água destilada por esguicho e submersão**
- 12- Coloração com hematoxilina de Mayer**
- 13- Lavagem com água corrente**
- 14- Desidratação e montagem**

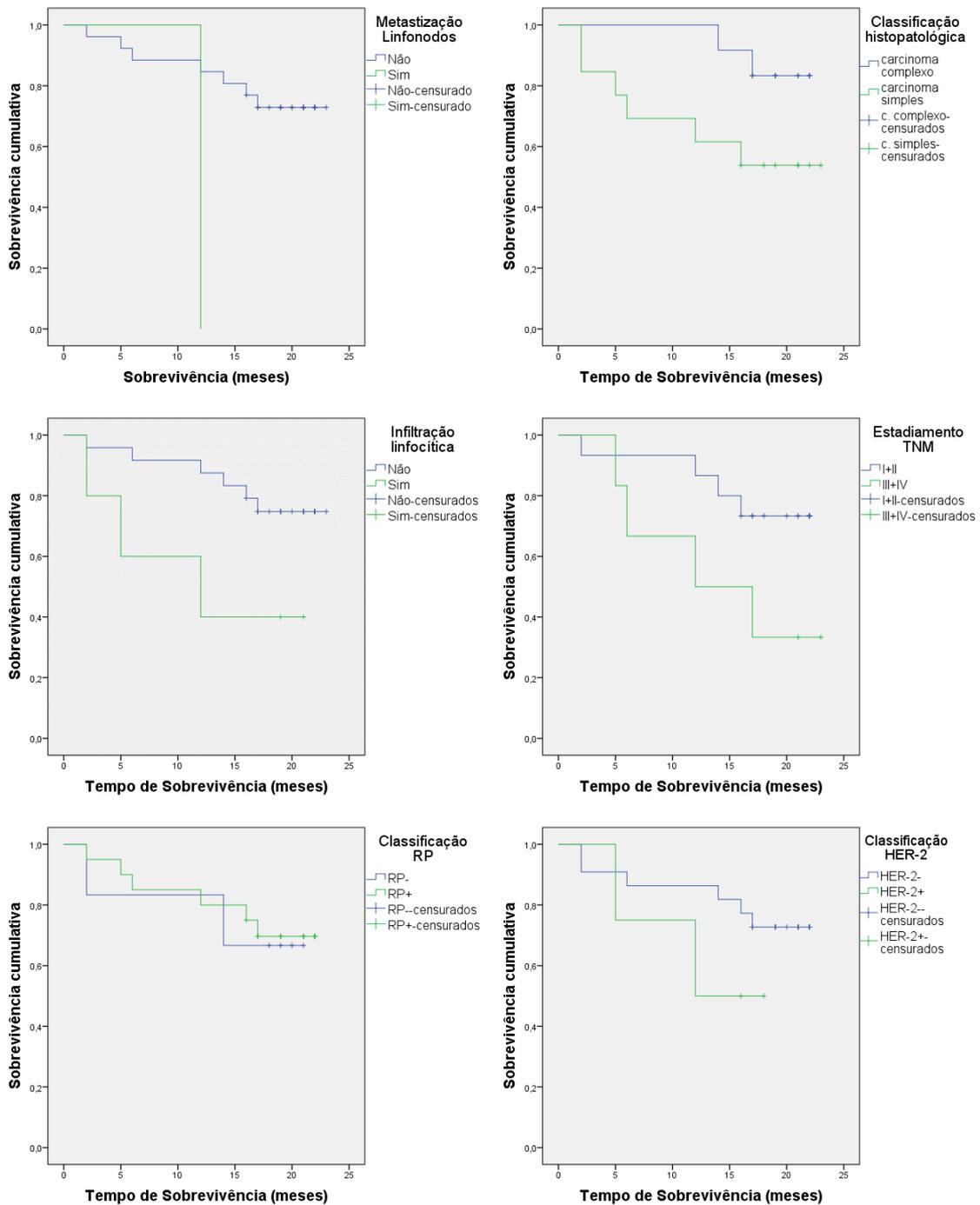
Nota: restantes informações quanto a especificidades do protocolo, caracterização de anticorpo primário utilizado e particularidades da sua utilização constantes nas Tabelas 3 e 4.

Anexo E – Curvas de Kaplan-Meier de tempo de sobrevivência para variáveis com valores de p mais significativos, marcadores moleculares e classificação molecular.



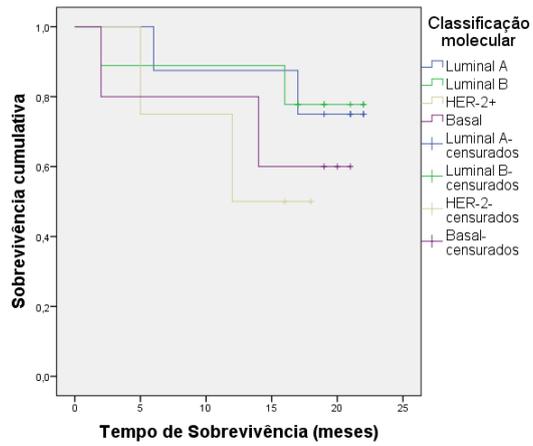
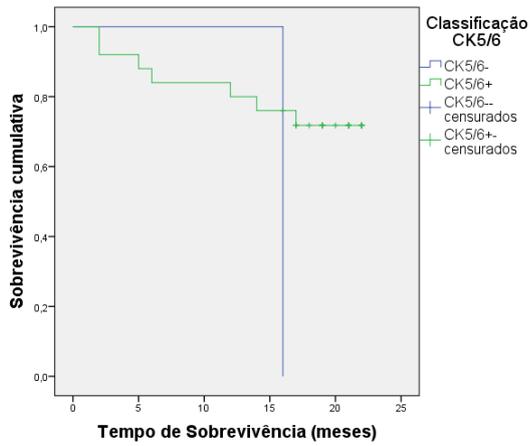
Curvas de Kaplan Meier de TS para Tamanho (OMS) (p=0.047), Tamanho (*cut-off* 3cm) (p=0.014), Ki-67 Peña (p=0.038), Ki-67 Peña2 (p=0.071), Ki-67 ORPHEO (0.600) e Ki-67 Gama (p=0.989).

Anexo E (cont.) – Curvas de Kaplan-Meier de tempo de sobrevivência para variáveis com valores de p mais significativos, marcadores moleculares e classificação molecular.



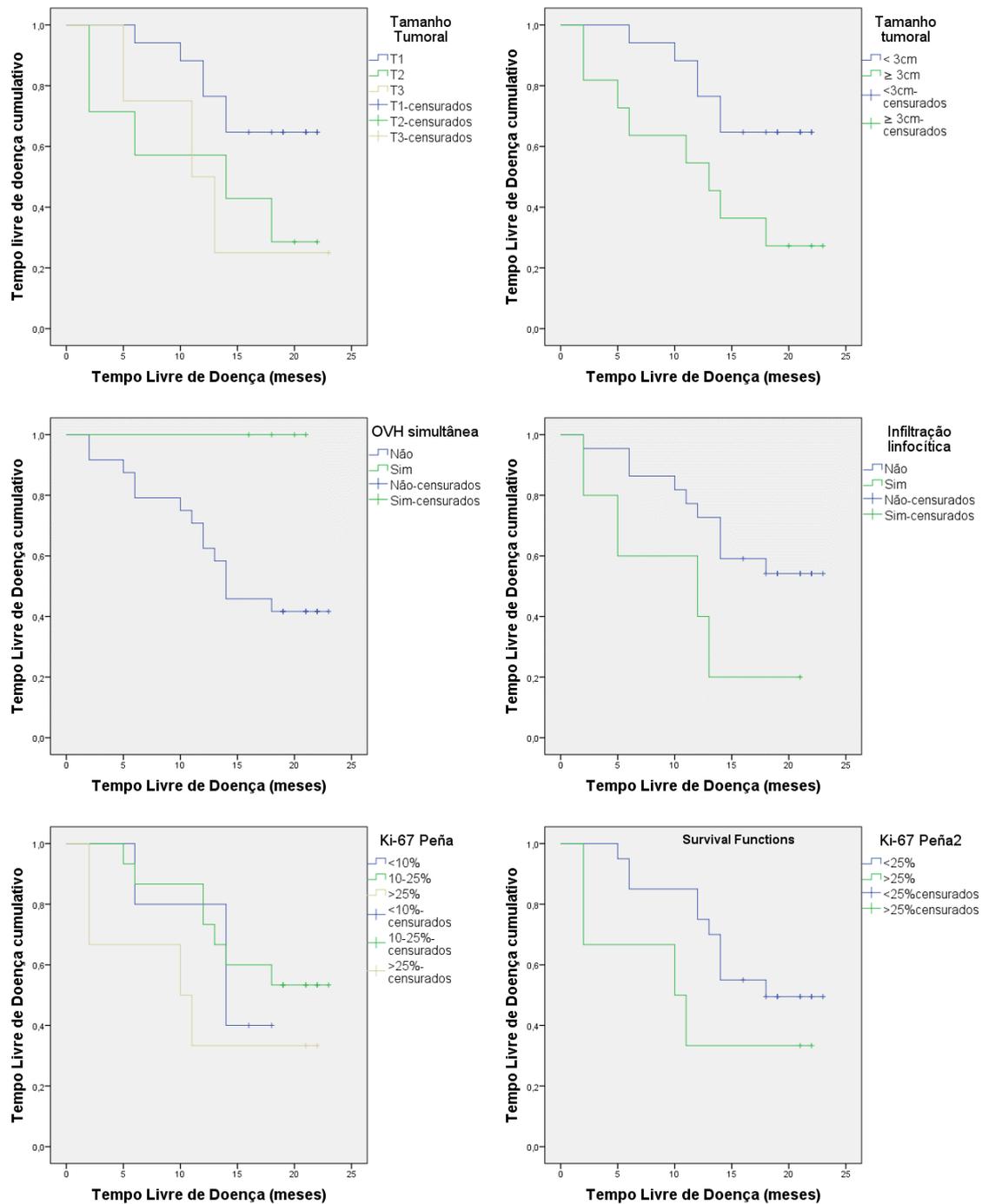
Curvas de Kaplan Meier de TS para Metastização para Linfonodos ($p=0.064$), Classificação Histopatológica ($p=0.081$), Infiltração Linfocítica ($p=0.056$), Estadiamento TNM (0.080), Classificação RP (0.847), Classificação HER-2 ($p=0.274$).

Anexo E (cont.) – Curvas de Kaplan-Meier de tempo de sobrevivência para variáveis com valores de p mais significativos, marcadores moleculares e classificação molecular.



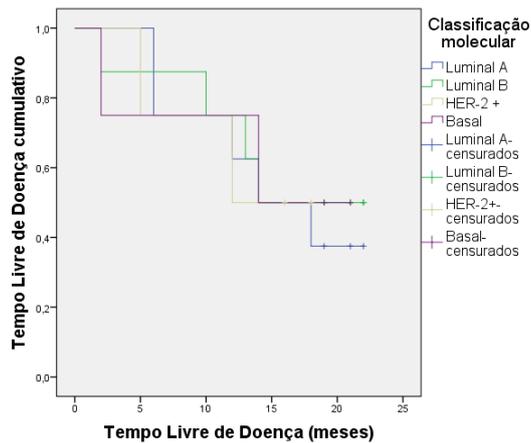
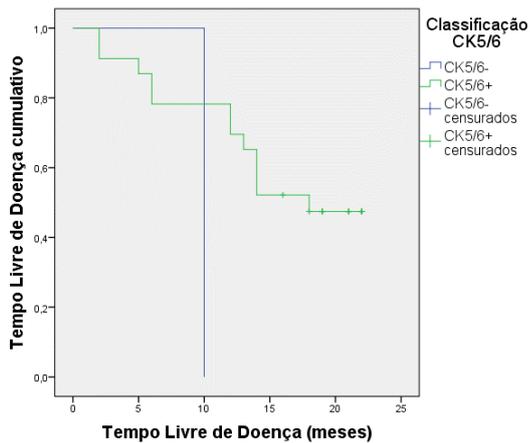
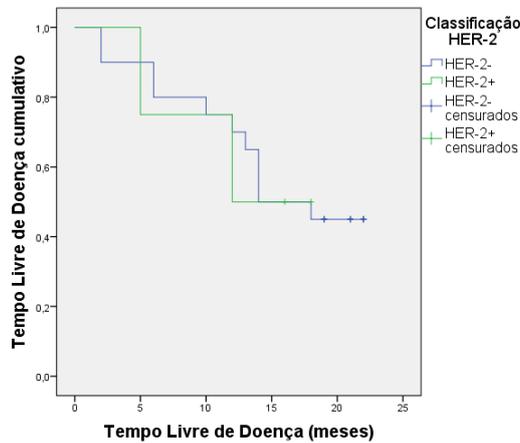
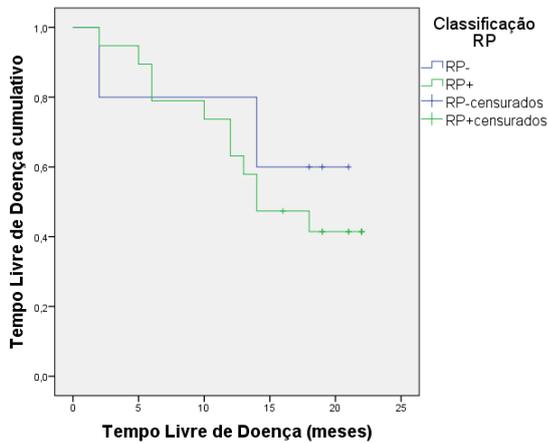
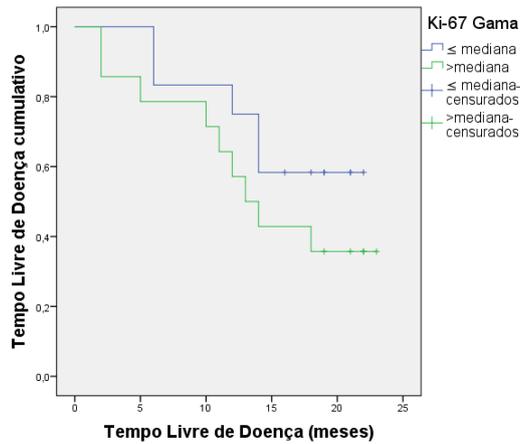
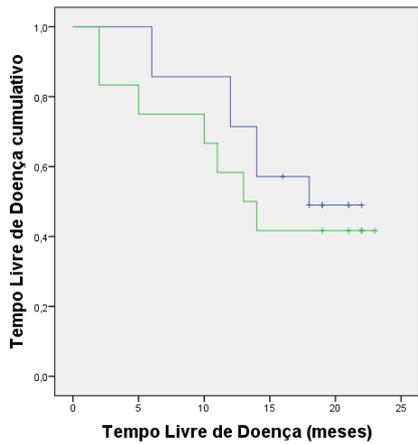
Curvas de Kaplan Meier de TS para Classificação CK5/6 (p=0.196) e Classificação Molecular (p=0.622).

Anexo F – Curvas de Kaplan-Meier de tempo livre de doença para variáveis com valores de p mais significativos, marcadores moleculares e classificação molecular.



Curvas de Kaplan Meier de TLD para Tamanho (OMS) (p=0.100), Tamanho (*cut-off* 3cm) (p=0.034), OVH simultânea (p=0.067), Infiltração Linfocítica (p=0.057), Ki-67 Peña (p=0.363) e Ki-67 Peña2 (p=0,169).

Anexo F (cont.) – Curvas de Kaplan-Meier de tempo livre de doença para variáveis com valores de p mais significativos, marcadores moleculares e classificação molecular.



Curvas de Kaplan Meier de TLD para Ki-67 ORPHEO (p=0.447), Ki-67 Gama (p=0.24), Classificação RP (p=0.513), Classificação HER-2 (p=0.941), Classificação CK5/6 (p=0.153) e Classificação Molecular (p=0.986).

Anexo G – Certificados (1/2) de participação em comunicações livres no X Congresso do Hospital Veterinário Montenegro, 2014.



Certificado

Certifico que a comunicação livre com o título
'Factores de prognóstico em tumores mamários felinos'
foi apresentada durante o X Congresso Hospital Veterinário
Montenegro, realizado nos dias 8 e 9 de fevereiro de 2014 no
Europarque de Santa Maria da Feira, tendo como autores:
Soares, M.; Ribeiro, R.; Pedrosa, A.; Mestre, M.; Caninhas, M.;
Correia, J. ; Ferreira, F.

Porto, 26 de Fevereiro de 2014

Luis Maltez



Anexo G (cont.) - Certificado (2/2) de participação em comunicações livres no X Congresso do Hospital Veterinário Montenegro, 2014.



Certificado

Certifico que a comunicação livre com o título
'Avaliação do índice de KI67 como marcador molecular de tumores
mamários felinos'

foi apresentada durante o X Congresso Hospital Veterinário
Montenegro, realizado nos dias 8 e 9 de fevereiro de 2014 no
Europarque de Santa Maria da Feira, tendo como autores:

Soares, M.; Ribeiro, R.; Pedrosa, A.; Carvalho, S.; Correia, J. ;
Ferreira, F.

Porto, 26 de Fevereiro de 2014

Luis Maltez

