

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**Correlação clínico patológica entre as imunomarcações de E-caderina e receptores de estrógeno nos tumores de mama em cadelas**

MARIA THEREZA BONFIM ENS

CUIABÁ – MT  
2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**Correlação clínico patológica entre as imunomarcações de E-caderina e receptores de estrógeno nos tumores de mama em cadelas**

Autora: Maria Thereza Bonfim Ens  
Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Caroline Argenta Pescador

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias área de concentração: Clínica Cirúrgica e Anestesiologia de Pequenos Animais, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

CUIABÁ – MT  
2021

### **Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.**

B713c Bonfim Enz, Maria Thereza.  
Correlação clínico patológica entre as imunomarcações de E-caderina e receptores de estrógeno nos tumores de mama em cadelas / Maria Thereza Bonfim Enz. -- 2020  
52 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientadora: Caroline Argenta Pescador.  
Co-orientador: Marcos de Almeida Souza.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Cuiabá, 2020.  
Inclui bibliografia.

1. Biomarcadores,. 2. característica clinicopatológicas. 3. cães fêmeas. 4. mamário.. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.**



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO**  
**PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**  
**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO: "Determinação histopatológica e imunohistoquímica de receptor de Estrógeno (RE) e E-caderina em tumores de mama de fêmeas caninas"**

AUTORA: MESTRANDA Maria Thereza Bonfim Ens

Dissertação defendida e aprovada em 04 de dezembro de 2020

**COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA**

1. Doutora Caroline Argenta Pescador (Presidente Banca / Orientadora)

INSTITUIÇÃO: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

2. Doutor Edson Moleta Colodel (Examinador Interno)

INSTITUIÇÃO: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

3. Doutor Flávio Henrique Bravim Caldeira (Examinador Externo)

INSTITUIÇÃO: INSTITUTO DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE RONDÔNIA

4. Doutor Marciel Becker (Examinador Suplente)

INSTITUIÇÃO: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

Cuiabá, 04 de dezembro de 2020



Documento assinado eletronicamente por **CAROLINE ARGENTA PESCADOR, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 04/12/2020, às 16:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flavio Henrique Bravim Caldeira, Usuário Externo**, em 11/12/2020, às 09:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **EDSON MOLETA COLODEL, Docente da Universidade Federal**



de Mato Grosso, em 17/12/2020, às 16:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufmt.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufmt.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3075087** e o código CRC **BCED3E54**.

Referência: Processo nº 23108.092242/2020-71

SEI nº 3075087

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que se esforçaram para eu desistir do que eu mais amava, principalmente aos que diretamente me derrubaram em todas as possibilidades possíveis.

## EPÍGRAFE

[...]“É que sempre determinamos nosso caminho físico sobre a terra como apenas uma linha e nunca como um plano; assim devemos, através da vida, se quisermos agarrar firmemente e possuir alguma coisa, deixar de lado, à direita e à esquerda do caminho, inúmeras outras coisas e renunciar a todas elas. Se não pudermos nos resolver, mas quisermos pegar tudo que nos chama a atenção de passagem, como uma criança em uma quermesse, será o mesmo que tentarmos transformar a linha de nosso caminho em um plano; ficaremos a correr em ziguezague, perseguindo aqui um vaga-lume, ali um fogo fátuo ilusório e permanecendo sem nada. **Quem deseja ser tudo, acaba não sendo nada. Quem tudo quer, tudo perde.**”

Schopenhauer

## RESUMO

O objetivo do trabalho é estabelecer uma correlação de variáveis clínicas com as neoplasias mamárias encontradas e sua correlação sobre marcadores tumorais, podendo assim, demandar um tratamento melhor estabelecido. A relação entre o receptor de estrogênio (ER) e a expressão epitelial da caderina (E-), detectada por características clínico-patológicas e métodos imunohistoquímicos, foi avaliada em 111 tumores mamários caninos. A maioria (n = 95; 85,58%) dos tumores eram histologicamente malignos e subclassificados como grau I (n = 42), grau II (n = 31) ou grau III (n = 22). Houve uma associação estatística significativa entre malignidade grau III e imunomarcagem negativa para estrogênio (p = 0,01). Nenhuma associação significativa pôde ser estabelecida entre a classificação histológica (neoplasia, benigna ou maligna) e imunomarcagem para ER e caderina-E. Vinte e um (22,10%) de 95 tumores mamários malignos metastatizaram. O carcinoma mamário simples (n = 9) foi significativamente associado à expressão ER negativa (p = 0,03), sugerindo um prognóstico ruim. Esses achados enfatizam a necessidade de melhorar os fatores prognósticos nos tumores mamários caninos.

**Palavras-chave:** Biomarcadores, característica clinicopatológicas, cães fêmeas, amário.

## **ABSTRACT**

The relationship between the oestrogen receptor (ER) and epithelial (E-) cadherin expression, as detected by clinicopathological features and immunohistochemical methods, was evaluated in 111 canine mammary tumours. The majority (n = 95; 85.58%) of tumours were histologically malignant and subclassified as grade I (n = 42), grade II (n=31), or grade III (n=2022). There was a significant statistical association between grade III malignancy and negative immunostaining for oestrogen (p= 0.01). No significant associations could be established between histological classification (neoplasm, benign or malignant) and immunostaining for ER and E-cadherin. Twenty-one (22.10%) of 95 malignant mammary tumours had metastasized. Twenty-four simple mammary carcinoma (n = 9) was significantly associated with negative ER expression (p = 0.03), suggesting a poor prognosis. These findings emphasize the necessity of improving prognostic factors in canine mammary tumours.

**Key words:** Biomarkers, clinicopathological features, female dogs, mammary cancer.

## **LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

**FIGURA 1:** Marcação para expressão de estrógeno. Canino. Mama. A- Carcinoma complexo em mama, marcações de intensidade forte; B- Canino. Mama. Carcinossarcoma, negativo para estrógeno; C- Canino. Carcinoma Complexo. Detalhes da marcação nuclear. D- Canino. Mama. Carcinoma em Tumor Misto com marcações menos intensas em núcleo celular.....51.

## **LISTA DE TABELAS**

TABELA 1. Similaridades entre tumor mamário canino e câncer mamário em humanos. Fonte: (ABDELMEGEED; MOHAMMED, 2018).

TABELA 2. Anticorpos e recuperação antigênica utilizados na imunohistoquímica.

TABELA 3. Resultado da associação clínica e variáveis em relação ao tipo tumoral em cadelas.

TABELA 4. Distribuição de casos classificados de acordo com o tamanho do tumor e raças pequenas comparado com os outros tamanhos.

TABELA 5. Associação entre tumores mamários malignos e sua graduação tumoral.

TABELA 6. ER e E-caderina, expressão em tumores mamários malignos e sua correlação com grau histológico.

TABELA 7. ER e E-caderina expressão e sua correlação com o tipo tumoral e metástase.

## **LISTA DE ABREVIACÃO**

% por cento

CMC - Carcinoma Mamário Canino

TM - Tumor de Mama

CM - Câncer de Mama

E2- Estrogênio

RE- Receptor de Estrógeno

E-cad - e-caderina

OHE - ovariopalingohisterectomia

IHQ - Imuno-histoquímica

HE - Hematoxilina e eosina

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>14</b>
2.1 Oncologia Veterinária.....	14
2.2 Predisposição de Raça .....	18
2.3 Idade .....	18
2.4 Variáveis Clínico Patológicas .....	18
2.5 Tamanho Tumoral e características consideráveis .....	19
2.6 Imunohistoquímica e marcadores tumorais .....	20
2.7 Estrógeno.....	22
2.8 E-caderina.....	25
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>2727</b>
3.3 Espécies .....	27
3.7 Imunohistoquímica.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b> 8
3.8 Análise Estatística.....	29
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
4.1 Animais e características Clínico Patológicas .....	30
4.2 Estudo IHC.....	33
4.3 Tumores Malignos.....	36
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>36</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>39</b>
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>411</b>
<b>8 APÊNDICE A – ARTIGO CIÊNTIFICO</b> .....	<b>46</b>
<b>9 APÊNDICE B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO</b> .....	<b>52</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Entre as diversas áreas existentes na clínica de cães, a oncologia veterinária tem se destacado na busca de melhorias na prevenção, diagnóstico e tratamento de neoplasias (NAGATA et al., 2014), já que tais enfermidades são afecções frequentes em cães. Tumores de glândula mamária são os neoplasmas mais comuns em cadelas fêmeas inteiras ou em pacientes mais velhas (EGENVALL et al., 2005). Em um estudo de 1.647 tumores mamários caninos, a prevalência de comparação entre tumores benignos: malignos foi de 1:2,75 (OLIVEIRA FILHO et al., 2010; LOPES; VARALLO, 2017). Carcinoma Mamário Canino (CMC) é um dos tumores mamários em fêmeas mais comum com uma incidência estimada de 192 casos por 100.000 cadelas, sendo que uma das maiores dificuldades é caracterizar as diferentes apresentações iniciais e comportamento biológico, variando de pequeno e não fortemente invasivo, para tumores grandes, extensos e invasivos, com nódulo ou não metastático (CHOCTEAU et al., 2019a)

Câncer de mama é o mais comum tumor diagnosticado em humanos e sua alta letalidade conduz a morte precoce de mulheres ao redor do mundo. Como resultado, a prevenção do câncer de mama e a intervenção terapêutica mais precoce, fez com que o número de diagnósticos crescesse consideravelmente (ABDELMEGEED; MOHAMMED, 2018). Os hormônios esteroidais produzidos pelos ovários são os principais agentes reguladores do crescimento e diferenciação do tecido mamário, exercendo sua função por meio da ligação com receptores celulares para o estrogênio (ER) e progesterona presentes na mama. Algumas neoplasias malignas de mama apresentam tais receptores hormonais em suas células tumorais, de modo que seu crescimento e desenvolvimento parecem depender de hormônios esteroides, principalmente do ER. Assim, determinar a expressão dos receptores de ER na mama é essencial para definir a sensibilidade do tumor à hormônioterapia, sendo responsivo quando há expressividade dos receptores hormonais esteroidais (GLASSMAN et al., 2014)

A imunohistoquímica (IHQ) é uma das principais ferramentas empregadas para diferenciar tumores biologicamente mais agressivos de tumores menos agressivos. E-caderinas/CDH1 (epitelia) é presente na maioria dos tecidos

epiteliais, como os do tecidos mamários, garantindo sua função estrutural e integridade. A desregulação, ou queda de E-caderina vem sido associada com variáveis clínico patológicas agressivas, metástase e diminuição do tempo livre de doença. Diversos estudos com imunohistoquímica foram relatados demonstrando a queda da imunexpressão na membrana de E-caderina assim como na parte citoplasmática interna em carcinomas mamários (CANADAS et al., 2019).

Neoplasias mamárias é o mais comum tumor diagnosticado em cadelas, porém com um presente desafio clínico a ser manejado. Muitos marcadores tumorais tem sido reportados para entender melhor essa doença e traçar um melhor direção para detecção e prognóstico clínico (LUU et al., 2019). Biomarcadores são normalmente proteínas mensuradas em sangue ou outros tecidos podendo dar informações sobre a presença da doença, podendo indicar o melhor tratamento para o paciente (KASZAK et al., 2018).

Durante a puberdade, hormônios esteróides são essenciais para mamogênese; durante a gravidez, eles completam o desenvolvimento de lóbulos e alvéolos que são induzidos por estimulação de progesterona e ER. Nos tumores mamários a expressão de ER é associada com características da doença e com graus de diferenciação tumorais. Em câncer de mama foi identificado uma grande quantidade de tumores com pele ulcerada e reduzido prognóstico de vida, exibindo um grau elevado de expressão de ER e as divergências entre expressão de E-caderina possuem um efeito significativo na terapia endócrina (ABDELMEGEED; MOHAMMED, 2018).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 – Oncologia Veterinária

A primeira avaliação comparativa entre câncer em animais e humanos foi registrada em 1960. Em adicional, existem mais registros de ocorrência oncológica em torno de 16 a 18 espécies e até em estudo experimental (BRØNDEN; FLAGSTAD; KRISTENSEN, 2007). Em medicina veterinária as doenças neoplásicas representam, atualmente, uma das maiores preocupações de saúde em canídeos e em felídeos (HUGHES; DOBSON, 2012). No entanto, também os tumores mamários da espécie canina e humana partilham várias características epidemiológicas, morfológicas, clínicopatológicas e bioquímicas (KUMARAGURUPARAN, PRATHIBA, & NAGINI, 2006; MÁRIO et al., 2010)

Alguns tipos de cânceres foram investigados quanto a sua evolução e investigado devido a possibilidade de serem estudados em cães e gatos como modelo de estudo para as ocorrências de câncer em humanos, como em casos de câncer de mama, leucemia e linfoma. Através desse registro, fatores de risco, gráficos geográficos e algumas tendências foram consideradas para investigação. A comparação entre a incidência de câncer em humanos e animais até no mesmo domicílio foi suspeitada (BRØNDEN; FLAGSTAD; KRISTENSEN, 2007). Também é amplamente discutida por Abdelmegeed et al., 2018 (Tabela 1).

Tabela 1. Similaridades entre tumor mamário canino e câncer mamário em humanos. Fonte (ABDELMEGEED; MOHAMMED, 2018)

Características	Humanos	Cães
Similares		
Ocorrência	Espontâneo	Espontâneo
Idade	Média e 62 anos	Média de ~10.5 anos o que equivale a 65.5 anos em uma mulher idosa
Curso da doença	Idêntico entre humano e cão	Idêntico a humano e cão
Tamanho tumoral	Similares entre humano e cães	Similares entre humanos e cães

Estágio Clínico	Idêntico em ambos as espécies	Idêntico em ambas as espécies
Invasão de linfonodos	Idêntico em humano e cão	Idêntico entre humano e cão
Mais comum entre tumores malignos	Neoplasia mamária	Neoplasia mamária
Dependência de estrogênio	Longa exposição de estrogênio, aumenta o risco da ocorrência tumoral	Cães não castrados possuem uma chance quadruplicada da ocorrência de tumor do que comparado com cães castrados com menos de 2 anos
Tipo Histológico	Carcinoma Invasivo Ductal	Carcinomas
Lesões pré-malignas	Prevalente	Prevalente
Marcadores moleculares	Um número de genes foram identificados, formando um papel crítico na carcinogênese de tumores mamários	Foi determinado que alguns genes possuem papel de identificar carcinogênese em tumores mamários caninos
Anomalias mamográficas	Humanos e cães apresentam semelhantes micro e macro calcificações	Humanos e cães apresentam semelhantes micro e macro calcificações

Os tumores mamários caninos (TMC) constituem aproximadamente 52% de todos os tumores que afetam as fêmeas desta espécie, embora a incidência mostre tendência para diminuir, uma vez que a prática da OSH em fêmeas jovens é cada vez mais comum (QUEIROGA; LOPES, 2002). A elevada incidência de doença oncológica nos animais de companhia, em alguns casos, superior à do homem, conduziu à realização de inúmeros estudos e ensaios clínicos (Vail & MacEwen, 2000; Withrow et al., 2013). Tumores em tecido

mamário, são os neoplasmas mais comuns que ocorrem em fêmeas não castradas – cadelas, ou quando castradas mais velha. (CHOCTEAU et al., 2019b). Em um estudo com mais de 1,647 tumores mamários, a prevalência de tumores benigno:maligno houve um ratio de 1:2.75, (FERREIRA et al., 2009; OLIVEIRA FILHO et al., 2010; VARALLO et al., 2019). A incidência realmente é maior quando não ocorre castração antes dos dois anos de vida ou quando em cães que fizeram o procedimento acima de 6 anos ou mais velhos – 9 a 11 anos também foram identificados (LUU et al., 2019).

Este fato é resultado da crescente prevalência destas doenças nos animais de companhia em virtude de uma maior procura de cuidados médicos por parte dos proprietários o que, por sua vez, conduz quer a um aumento no número de diagnósticos realizados pelos médicos veterinários, quer ao aumento da esperança de vida dos animais (WITHROW, VAIL & PAGE, 2013). Enquanto o registro de incidência de câncer já tem sido relatado desde os anos de 1940 e em grande crescimento, ainda o registro em animais são menores com vida curta e esporádica. Ainda há apenas pequenos e poucos dados realmente informativos passível de avaliação quanto a incidência dos diferentes tipos de câncer em relação a população animal em qualquer lugar do mundo. (BRØNDEN; FLAGSTAD; KRISTENSEN, 2007)

Os animais têm sido usados como modelos para alguns tipos de câncer que ocorrem com pouca frequência em humanos. A formação espontânea de neoplasma em animais de companhia pode promover o uso desses como modelo estudo para comparação e efeitos ambientais negativos onde possa constituir espécies sentinelas na biologia do câncer em animais e em humanos para então traçar modelos terapêuticos.

A grande relatividade entre a alta incidência de alguns cânceres, de forma comportamental biológica bem similar, tamanhos grandes, citotoxinas responsáveis presente agindo, menor sobrevida e períodos sem recidivas menores quando comparado com os animais x humanos, são fatores que contribuem para utilização desses, como modelo comparativo (BRØNDEN; FLAGSTAD; KRISTENSEN, 2007). Mas utilizar pets como modelo de estudo possui uma certa limitação quando utilizado gatos ou cães por exemplo, pois precisa de uma confiança por parte do tutor, além de tempo e custo para

tratamento, seja para estudo veterinário ou para o próprio estudo de câncer de mama em humanos (ABDELMEGEED & MOHAMMED, 2018).

A oncologia representa um desafio no exercício da medicina veterinária atual, desde o diagnóstico da doença até ao seu tratamento, passando pela gestão de expectativas dos proprietários e, por esta razão, deverá fazer parte integrante da formação do médico veterinário (WITHROW ET AL., 2013). Este deverá procurar atingir a cura da doença ou, na sua impossibilidade, transformá-la, não numa afeção aguda com alta mortalidade, mas sim numa crônica possível de gerir (WITHROW ET AL., 2013). O grande avanço do estudo de genomas cancerígenos, proporciona a busca também por marcadores de prognóstico tumoral em CM em cães (VARALLO et al., 2019).

Em 2010, Filho et al., já havia descrito sua alta prevalência quando publicado um estudo retrospectivo de mais de 1.600 casos de tumores mamários, com casuística mais agravada: presença de metástase, carcinomas, idades mais avançadas. Cintra em 2011, descreve a alta incidência de tumores de mamas em mulheres e sua importância quanto à avaliação IHQ como preconizador para um melhor diagnóstico, além de suas variáveis clínico-patológicas. Vários estudos investigaram também a incidência e prevalência das neoplasias mais frequentes assim como os seus locais de origem.

Tumores mamários caninos e humanos compartilham importantes fatores epidemiológicos, clínico-patológicos e bioquímicos. Sabe-se que em humanos um grande número de fatores é indicador do prognóstico do câncer de mama, incluindo tipo tumoral, tamanho e classificação, além de comprometimento ou não do tecido linfóide adjacente (BERTON; TERZIAN; RUIZ, 2008).

É muito importante que sejam retirados todos os tumores e enviados (devidamente identificados) para exame histopatológico. Nas cadelas é comum coexistirem nódulos de diferentes tipos histológicos e com comportamento biológico distinto, pelo que um único nódulo pode não ser representativo do tumor de maior agressividade clínica. Os gânglios linfáticos regionais (axilares e inguinais), devem ser avaliados clinicamente e por citologia e removidos caso estejam afetados (QUEIROGA; LOPES, 2002).

## **2.2 Predisposição de raça**

Em alguns estudos recentes foi demonstrado que não existe uma predisposição racial evidente, mas raças de caça são apontadas por alguns autores como tendo uma maior predisposição para esta patologia (QUEIROGA; LOPES, 2002; RAPOSO et al., 2015). Por esta razão tem sido possível estabelecer uma predisposição racial para as neoplasias mamárias uma vez que depende muito de cada local onde é preconizado o estudo.

## **2.3 Idade**

A prevalência de idades superiores a 7 anos já vem sendo citada por vários autores, assim como (ABE-SANDES et al., 2010; CARVALHO, 2012; TORÍBIO et al., 2012). A maioria afeta cadelas com idades compreendidas entre os 8 e os 10 anos, no entanto, podem surgir tumores malignos em cadelas com menos de 5 anos (QUEIROGA; LOPES, 2002).

A incidência de neoplasias mamárias aumentou na última década (ZHANG et al., 2018). Como o risco de desenvolvimento tumoral aumenta com a idade, um dos fatores explicativos desta maior incidência encontrada é o aumento da esperança média de vida dos animais domésticos (MÁRIO et al., 2010; ZHANG et al., 2018)

## **2.4 Variáveis clínico patológicas**

Diversos critérios morfológicos têm sido utilizados para descrever ou nomear a agressividade de um tumor. Dentre estes critérios incluem-se o tipo histológico, o grau de polimorfismo nuclear, a presença ou ausência de resposta inflamatória, o número de mitoses e o comprometimento de vasos sanguíneos e linfáticos, dentre outros (MELO E SILVA; SADDI; MOMOTUK, 2002).

A heterogeneidade tumoral do carcinoma da mama é um dos maiores desafios a ser enfrentado tendo em vista que tumores com os mesmos tipos histológicos, estádios e graus de diferenciação podem apresentar desfechos distintos em relação aos fatores prognósticos e às respostas aos tratamentos instituídos. Percebe-se que, para melhor entendimento e caracterização dos tumores da mama, a classificação tradicional atualmente utilizada se mostra

insuficiente (CASSALI et al., 2014; DUARTE CINTRA et al., 2012; GUERRA et al., 2009).

Na gênese destas neoplasias estão envolvidos fatores de natureza genética, ambiental e hormonal. O papel das hormonas sexuais na gênese destas neoplasias está extensamente estudado e estabelecido (QUEIROGA; LOPES, 2002).

Os (potenciais) fatores prognósticos para mulheres podem ser agrupados em 4 gerações. Na primeira geração, estariam os fatores clássicos, já conhecidos como o estágio (TNM), o subtipo histológico e a idade da paciente. A segunda geração inclui marcadores de reconhecida validade, como os receptores de ER e progesterona, patologia quantitativa, também chamada de estereologia ou morfometria, que possibilita quantificar estruturas morfológicas além de marcadores de proliferação celular. Em relação à patologia quantitativa, a contagem de mitoses tem seu valor já bem definido, tanto que faz parte da caracterização da diferenciação das lesões. A ploidia e a morfometria têm sido estudados, sem que se tenha definido, até agora, seu valor como fator independente de prognóstico. Na terceira geração estão os marcadores genéticos, como oncogenes (neu, myc, bcl2), genes mutados ou não expressos (p53, rb), proteases (catepsina D) entre outros. A quarta geração é constituída pelos chamados preditores de metástases órgão específicas. Alguns estudos mostram que tumores que expressam o paratormônio ou possuem micrometástases na medula óssea, mais frequentemente apresentam metástases ósseas (BERTON; TERZIAN; RUIZ, 2008)

## **2.5 Tamanho Tumoral e algumas características consideráveis**

Em regra, o tamanho dos tumores pode variar, desde pequenos nódulos com 0,5 cm de diâmetro até tumores com mais de 15cm no seu maior diâmetro.

Em alguns animais o tumor pode apresentar ulceração cutânea ou sinais evidentes de inflamação, como é o caso do carcinoma inflamatório (QUEIROGA; LOPES, 2002). Um marcador prognóstico pode ser definido como qualquer marcador capaz de, no momento do diagnóstico (ou cirurgia) da neoplasia, fornecer informações a respeito da sua evolução clínica. Para tal, este marcador deve estar relacionado a determinadas características biológicas envolvidas na

transformação celular neoplásica, no crescimento tumoral ou no processo da cascata metastática. Este mesmo marcador poderá ser considerado como preditivo, quando fornecer informações úteis na seleção de pacientes susceptíveis à determinada terapêutica específica. O protótipo do marcador preditivo são os receptores hormonais que mediam a resposta à terapêutica hormonal adjuvante (BERTON; TERZIAN; RUIZ, 2008).

## **2.6 Imunohistoquímica e marcadores tumorais**

A técnica de IHQ foi iniciada com a marcação dos anticorpos com enzimas, que se mostraram instrumentos simples, versáteis e práticos para o diagnóstico histopatológico. Assim, a técnica de IHQ se baseia na capacidade que têm os anticorpos específicos de se ligarem a antígenos correspondentes. A reação de ligação não é visível a menos que o anticorpo esteja marcado com uma substância que absorva ou emita luz e que, assim, produza um contraste ou cor. O complexo enzima-anticorpo é capaz de se ligar ao antígeno específico no tecido e alterar a cor do cromogênio apropriado. A peroxidase e a fosfatase alcalina são as enzimas mais usadas, sendo a peroxidase o marcador de preferência na maior parte das técnicas de diagnóstico imunohistoquímico. Segundo Gärtner o método da IHQ tem revolucionado a classificação dos tumores de origem desconhecida, pois os anticorpos reconhecem antígenos que são expressos por células de histogênese específica. Nas últimas décadas a imunohistoquímica tem revolucionado a prática da Anatomia Patológica. Além do inestimável auxílio ao diagnóstico de diferentes tipos de neoplasia, as técnicas de IHQ têm permitido a identificação de diferentes tipos de marcadores (enzimas, receptores, produtos de genes, etc.) que estão relacionados ao comportamento biológico das neoplasias tanto em mulheres como em cadelas. Nesse campo, a disponibilidade de anticorpos monoclonais que reagem com antígenos associados aos tumores de mama está se expandindo progressivamente e, dessa forma, vem permitindo que se conheça melhor a biologia da referida neoplasia, oferecendo, com isso, um prognóstico, um diagnóstico e um tratamento mais estruturado para o controle dessa classe tumoral. Neste contexto, o estudo das similaridades moleculares entre os tumores humanos e caninos pode ser de grande interesse, não somente do ponto de vista etiopatogenético, mas também por propiciar modelos animais

adequados para o manejo clínico do câncer de mama (BERTON; TERZIAN; RUIZ, 2008).

Um marcador prognóstico pode ser definido como qualquer marcador capaz de, no momento do diagnóstico (ou cirurgia) da neoplasia, fornecer informações a respeito da sua evolução clínica. Para tal, este marcador deve estar relacionado a determinadas características biológicas envolvidas na transformação celular neoplásica, no crescimento tumoral ou no processo da cascata metastática. Este mesmo marcador poderá ser considerado como preditivo, quando fornecer informações úteis na seleção de pacientes susceptíveis à determinada terapêutica específica. O protótipo do marcador preditivo são os receptores hormonais que mediam a resposta à terapêutica hormonal adjuvante (BERTON; TERZIAN; RUIZ, 2008).

Cada célula cancerígena expressa proteínas específicas que são chamadas de antígeno associado ao tumor. Em alguns pacientes com tumores, esses antígenos são chamados de biomarcadores, pois são detectados em outros tecidos, seroma ou urina em altas concentrações (FADARE; TAVASSOLI, 2008). Portanto, nós podemos distinguir entre seroma e tecido com os marcadores tumorais. Na medicina humana, biomarcadores podem desempenhar um papel importante se identificados em cânceres de mama quando relacionado ao acompanhamento. Esse tipo de câncer, possui expressões em IHQ similares entre humano e os tumores mamários caninos, expressando marcadores semelhantes, portanto pode se considerar pode ser considerado a avaliação dos mesmos (KASZAK et al., 2018).

Em cadelas, os maiores fatores preditivos para metástase, como comprometimento de linfonodo ou grau histológico do tumor, falharam em classificar os tumores mamários de acordo com seu comportamento clínico.

Dessa forma, embora se trate de um procedimento mais complexo, a avaliação da expressão de um ou mais imunomarcadores de prognóstico apresenta-se como uma ferramenta mais útil e conclusiva (BERTON; TERZIAN; RUIZ, 2008). Atualmente o estudo da expressão de marcadores prognósticos e preditivos do câncer de mama na mulher, através da metodologia de IHQ, têm se revelado importante ferramenta de trabalho na rotina diagnóstica e de pesquisa (BERTON; TERZIAN; RUIZ, 2008).

Assim como em seres humanos, na veterinária o papel do patologista na avaliação dos tumores mamários transcende aquele de simplesmente caracterizar corretamente a histogênese das neoplasias. As informações como expressão de receptores hormonais ou mesmo características proliferativas do tumor são, sem dúvida, definitivas na escolha de um esquema terapêutico correto (BERTON; TERZIAN; RUIZ, 2008). Poucos estudos têm medido a expressão dos marcadores biológicos no prognóstico dos tumores.

Embora ainda não se tenha unanimidade sobre a validade individual dos marcadores mais comumente utilizados nos painéis de mama na mulher, parece haver um consenso sobre os alguns pontos. É importante verificar o *status* hormonal, para que se possa saber com certo grau de certeza, as chances de uma determinada lesão responder à terapêutica hormonal (BERTON; TERZIAN; RUIZ, 2008).

As reações de IHQ podem ser utilizadas nas mais diferentes situações dentro de um laboratório de patologia cirúrgica. As mais importantes são: 1) elucidação do tecido de origem de uma neoplasia indiferenciada; 2) determinação do órgão de origem de uma neoplasia diferenciada; 3) subclassificação de linfomas; 4) pesquisa de fatores prognósticos, terapêuticos e índices proliferativos de algumas neoplasias; 5) identificação de estruturas, organismos e materiais secretados pelas células; 6) detecção de células neoplásicas metastáticas (WERNER et al., 2005).

## **2.7 Estrógeno**

Um dos fatores que diminui o risco de desenvolvimento de tumores mamários é a realização de ovariectomia, sendo esta comum nos EUA. mas ainda não tão frequente nos países europeus (Ruteman et al., 2001; MÁRIO et al., 2010). No que diz respeito a ação de ER, uma das ações desempenhadas por este hormônio, que contribui para o crescimento das neoplasias mamárias, consiste no estímulo à produção do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (Dabrosin, Margetts & Gauldie, 2003; Illera et al., 2006; MÁRIO et al., 2010)

Num estudo efetuado por YAGER; DAVIDSON, (2006) foi sugerido que a maior parte dos receptores de progesterona presentes nos tumores mamários do cão apresentam-se na forma não ligada. Na medida em que os receptores

das hormonas esteróides podem ser ativados através dum mecanismo dependente dum ligando, na ausência de ligação estes permanecem associados a um complexo transcricionalmente inativo, o qual se encontra localizado no citoplasma. Aquando da ligação, os receptores são libertados do complexo e translocados para o núcleo. O mecanismo clássico da ação direta do ER no núcleo do DNA, envolve a ligação do hormônio aos receptores nucleares de ER, que depois se ligam como dímeros como elemento para resposta ao ER nas regiões reguladoras desses genes responsivos ao ER em associação com fatores de transcrição basal, co-ativadores e co-expressores, para alteração na expressão genética. Desde o começo a iniciação das descobertas e caracterizações dos receptores de ER nos anos de 1960, mostrou-se pesquisas muito complexas principalmente quando passou a descobrir até o receptor de estrógeno b (REb), que foram sinalizadas mediante aos receptores que estavam associados a mitocôndria e membrana plasmática, (YAGER; DAVIDSON, 2006).

O ER atravessa as membranas celular e nuclear por difusão passiva, sem a intervenção de canais ou proteínas transmembrana. Ao chegar ao núcleo, liga-se ao receptor de ER, formando um complexo que ativa sequências específicas de genes que, por sua vez, controlam o crescimento e a diferenciação celular. Desta forma, é responsável pela proliferação de células epiteliais durante o pico estrogênico do ciclo menstrual, e, indiretamente, pela sua posterior morte no final do ciclo. A relação do ER com os carcinomas mamários não é uma novidade na literatura médica: Já em 1896, Beatson descreveu a regressão de metástases de carcinoma de mama em mulheres após oforectomia, em paciente pré-menopausa. Seus achados, no entanto, foram ignorados até 1950, quando alguns estudos mostraram a regressão de tumores após adrenalectomia ou hipofisectomia, desta vez em mulheres menopausadas. Estes achados vieram ao encontro das descrições, em 1940, da influência de ER sintéticos no crescimento de tumores mamários. Assim, temos, atualmente, três formas de tratamento hormonal para os carcinomas mamários: a) castração química por inibição da liberação de gonadotrofinas; b) inibidores da síntese de hormônios; c) antagonistas hormonais (Tamoxifen). Quando usada de forma aleatória, a terapêutica hormonal é eficaz em cerca de 30% dos casos. Por outro lado, cerca de 60% das pacientes com lesões positivas para receptores hormonais

respondem a esta forma terapêutica, enquanto menos de 10% de pacientes com lesões negativas para receptores hormonais respondem ao tratamento (YAGER; DAVIDSON, 2006; BERTON; TERZIAN; RUIZ, 2008)

Sabe-se que ER e progesterona são essenciais para a formação do tecido mamário normal e seu desenvolvimento. Ambos também influenciam no crescimento tumoral, conseqüentemente, (CANADAS-SOUSA et al., 2019; CANADAS et al., 2019; KASZAK et al., 2018). A associação do risco de câncer de mama e a persistência dos níveis de ER no sangue já tem sido alvo de diversos estudos (YAGER; DAVIDSON, 2006)

Sabe-se, ainda, que mulheres obesas apresentam elevadas concentrações de estrógeno proveniente da transformação, no tecido adiposo, da androstenediona em estrona e, posteriormente, em ER, que já é sabidamente envolvido na carcinogênese mamária. As evidências clínicas também apoiam o papel desse, na carcinogênese. A capacidade de suprimir o crescimento tumoral, quando retirado o E2 foi demonstrado por Beatson em 1896, quando realizou ooforectomia para avaliação do câncer de mama em mulheres jovens com estágio já avançado. A descoberta paradoxal posterior que doses de E2 farmacológicas, podem inibir o crescimento do câncer de mama é explicada porque a mesma inicia um processo de vias desencadeamento de vias apoptóticas após aparentemente, em um período de privação de ER, (YAGER; DAVIDSON, 2006).

Atualmente esses marcadores são comumente usados para definição do tratamento e estabelecimento do prognóstico da doença, associados a variáveis clínicas e patológicas, tais como o envolvimento linfonodal, tamanho do tumor, tipo histológico, grau do tumor e margens cirúrgicas (DUARTE CINTRA et al., 2012; CANADAS-SOUSA et al., 2019; CANADAS et al., 2019)

Os maiores dos tumores mamários – benigno ou maligno – expressam ER. Adicionalmente, prolactina e hormônios do crescimento também estão envolvidos no processo de crescimento tumoral. Tumores mamários podem expressar baixa ou altos índices hormonais. Quando baixas expressões, consideram-se que não são sensitivos em tratamentos de terapia endócrina, relatando-se também um pior prognóstico. Enquanto isso, tumores com alta expressão hormonal, possuem resultados melhores clínicos. Ambos receptores são apenas detectados em tumores de células epiteliais, (KASZAK et al., 2018)

Na medicina veterinária, alguns estudos vem demonstrando que essa expressão de um ou os dois receptores são mais frequentes em tumores benignos. Mas no geral a sua expressão tem sido correlacionada a melhores e favoráveis prognósticos (KASZAK et al., 2018).

A maioria dos tumores mamários caninos são relatados em fêmeas, e poucos casos são documentados relatando secreção de E2 em machos, correlacionado a tumores de testículo. Além disso, a terapia hormonal contraceptiva em cães que tem sido altamente ligado a incidência de um teor maior de risco para carcinogênese (CANADAS-SOUSA et al., 2019). Essas observações dão sustentação à hipótese de que os metabólitos oxidativos do E2 tem potencial genotóxico, mutagênico, transformador além de potencial carcinogênico, podendo sim iniciar e causar a progressão também de câncer em humanos (YAGER; DAVIDSON, 2006).

Em termos práticos, a marcação dos receptores hormonais é especificamente nuclear, sendo os eventuais casos com padrão citoplasmático considerados negativos. Existem numerosos sistemas para expressar os resultados, mas o importante é que se relate a proporção de células neoplásicas positivas e a intensidade de coloração (BERTON; TERZIAN; RUIZ, 2008)

## **2.8 E-caderina**

O reconhecimento de um papel importante das caderinas na determinação do fenótipo epitelial, na migração e diferenciação celular, e na disseminação tumoral tem estimulado um enorme interesse nesta família de moléculas de adesão (PAREDES et al., 2006). As caderinas são moléculas de adesão dependentes de cálcio, mediando a adesão célula-célula homotípica. Sua principal função é a manutenção da arquitetura normal dos tecidos, particularmente como componentes das junções aderentes (PAREDES et al., 2006; MATOS et al., 2006; BERTON; TERZIAN; RUIZ, 2008). Sua função é manter a estrutura normal de um tecido. Entre as caderinas, existem E-, P- e N-caderina. A caderina-P (caderina-placentária) é expressa nas células mioepiteliais, e sua superexpressão em tumores de alto grau sugere agressividade do tumor e um mau prognóstico. A E-caderina é expressa tanto pelas células mioepiteliais como pelas células luminosas (PAREDES et al., 2006). No entanto, a caderina mais frequentemente avaliada é a caderina-E

(caderina epitelial), que está envolvida na adesão celular epitelial. (KASZAK et al., 2018). A caderina-E é a principal caderina envolvida na adesão celular epitelial. Possui um domínio extracelular (terminal N) que se liga com alta especificidade a domínios semelhantes nas células adjacentes e um domínio intracelular (terminal C) que se liga às proteínas do citoesqueleto por meio de caderinas. Uma vez que a maioria dos tumores animais, incluindo os do homem e do cão são de origem epitelial, a E-caderina tem sido amplamente estudada em relação ao seu papel na tumorigênese. A expressão e função da caderina-E são frequentemente alteradas nos tumores epiteliais humanos, incluindo os da mama (MATOS et al., 2006). A caderina-E (cad-E) é uma glicoproteína transmembrana de 120 quilo Dalton que está distante da superfamília da imunoglobulina. Medeia a adesão célula-célula homotípica dependente de cálcio, mantendo assim o fenótipo adesivo normal das células epiteliais (GUPTA; DESHPANDE; BADVE, 2003) O gene E-caderina está localizado no cromossomo humano na região 16q22.1, região frequentemente afetada por baixa heterozigose em neoplasias mamárias esporádicas. A alta expressão da E-caderina nos indica que a adesão entre as células está preservada e, deste modo, o risco de metástases à distância é consideravelmente baixo já que a possibilidade de células neoplásicas atingirem a corrente circulatória é quase que nula, (BERTON; TERZIAN; RUIZ, 2008). Como marcador de bom prognóstico na espécie podemos utilizar a e-caderina, cuja expressão demonstrou ser estatisticamente significativa para prever a possibilidade de metastização do processo (BERTON; TERZIAN; RUIZ, 2008).

Os tumores E-cad-negativos ainda são capazes de formar túbulos. Pense-se que a perda da expressão de E-cad facilite o descolamento de células tumorais do tumor primário. Redução ou perda de expressão de E-cad ou cateninas (que, juntamente com com E-cad, unidades E-cad / catenina) está associado a invasão, metástase e mau prognóstico em vários tipos de neoplasias humanas, incluindo câncer de mama (GUPTA; DESHPANDE; BADVE, 2003) Segundo um estudo a perda da expressão da E-caderina, associada com alterações na adesão entre as células, tem associação significativamente alta com a sobrevivência do paciente ( $P=0,020$ ) e o período livre de metástases

( $P=0,0052$ ), sendo assim, a E-caderina tem alta significância como fator prognóstico (BERTON; TERZIAN; RUIZ, 2008).

Na medicina veterinária, como a maioria dos tumores mamários caninos é de origem epitelial, uma expressão reduzida de caderina-E está relacionada ao aumento do desenvolvimento e progressão da doença, malignidade tumoral, agressividade das metástases e sobrevida global curta. A caderina-E se liga a um grupo de proteínas interconectadas chamadas cateninas, geralmente com  $\beta$ -catenina. A  $\beta$ -catenina interage com o domínio citoplasmático da E-caderina e permite o agrupamento em estruturas juncionais. Qualquer disfunção desse complexo reduz a adesão celular. A  $\beta$ -catenina é uma proteína citoplasmática que é degradada no processo neoplásico, o que resulta em seu acúmulo no citoplasma e no núcleo das células tumorais. Sua expressão está associada à progressão tumoral, metástases e pior prognóstico para o paciente. Normalmente, os níveis de expressão de  $\beta$ -catenina no sangue são determinados juntamente com a caderina-E (KASZAK et al., 2018).

Dois estudos de tumores mamários caninos encontraram uma associação entre a expressão da caderina-E e o tipo e diferenciação do tumor mas não necessariamente avaliando outras variáveis clínico patológicas (MATOS et al., 2006)

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Espécies**

Os casos analisados dos 111 cães com tumores da glândula mamária (TGMs) foram obtidos nos arquivos do Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. As amostras que estavam guardadas em um banco de dados, foram previamente fixadas em formalina tamponada neutra a 10% e incluídas em cera de parafina. Seções ( $3\mu\text{m}$  de espessura) foram cortadas e coradas com hematoxilina e eosina, com um bloco representativo selecionado para estudos de IHQ. Os tumores foram classificados de acordo com os critérios diagnósticos da OMS para a classificação histológica dos tumores mamários de animais domésticos (MISDORP W., 2002). A formação de túbulos, o pleomorfismo nuclear e o índice

mitótico foram pontuados em uma escala de 1-3 (leve, moderada ou marcada) e as notas foram baseadas na pontuação total: grau I (bem diferenciado): 3-5 pontos, grau II (moderadamente diferenciado): 6-7 pontos e grau III (pouco diferenciado): 8-9 pontos.

As seguintes variáveis foram consideradas para o estudo: espécie (apenas canino), raça, sexo (fêmea), idade, tamanho da raça, status de OSH, tamanho do tumor (diâmetro) (<3 cm, T1; 3cm a 5cm, T2; >5cm, T3) (CEROVŠEK et al., 2013), ulceração, tipo histológico, envolvimento de linfonodos inguinais, expressão positiva para marcadores ER e E-caderina e seus respectivos graus por IHQ.

### **3.2 Imunohistoquímica**

Cortes (3 µm de espessura) dos tumores mamários foram desparafinados com xilol, seguidos de banhos em concentrações decrescentes de soluções de álcool, em seguida lavados com solução salina tamponada com fosfato e água destilada. Para a imunomarcagem de E-caderina, a recuperação antigênica foi induzida por aquecimento das seções em tampão Tris-EDTA (pH 9,0) por 20 min a 97°C, e, para a imunomarcagem de ER, a recuperação antigênica foi induzida em banho-maria com tampão citrato (pH 6,0). Em seguida, a peroxidase endógena foi bloqueada pela imersão dos cortes em peróxido de hidrogênio 3% por 20 min, seguido do bloqueio da proteína com leite Molico® 5%. As seções foram incubadas com anticorpos primários anti-E-caderina e anti-ER em câmara úmida a 4 °C durante a noite. O anticorpo secundário utilizado foi estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB + System HRP, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), e as amostras foram incubadas por 20 min em temperatura ambiente. A imunorreação foi desenvolvida com cromogênio 3,3-diaminobenzidina tetrahidroclorato (Liquid DAB + Substrate Chromogen System, DakoCytomation, Carpinteria, California.). E as seções foram contrastadas com hematoxilina. Para cada anticorpo, a concentração, marca, padrão de rotulagem e controle positivo usados estão listados na Tabela 2.

A análise quantitativa automática de imunomarcagem para ER e E-caderina foi realizada usando cinco bioimagens digitais por lâmina por cão, em que apenas o tecido mamário foi selecionado como a região de interesse. As

bioimagens foram capturadas em microscópio óptico (Axio Imager A2, Carl Zeiss, Alemanha) com aumento de 400x, padronizado em resolução e tamanho (2560 × 1920 pixels; 32 bits/pixel; RGB). Essas imagens foram pré-processadas e segmentadas usando o plugin de deconvolução de cor (RUIFROK AC & JOHNSTON DA., 2001), binarização e delimitação de contorno (divisor de águas) para quantificar o número absoluto de células positivas por slide (SHI P et al., 2016). Todas as operações foram realizadas usando o software Fiji / Image J (versão 1.52p, National Institutes of Health, EUA) (SCHINDELIN J et al., 2012).

### 3.3 Análise estatística

A análise estatística baseou-se na apresentação descritiva dos resultados de cães com câncer mamário por meio de frequências absolutas e relativas. A associação entre as variáveis categóricas relacionadas ao tumor mamário e a expressão imunohistoquímica para ER ou E-caderina foi avaliada pelo teste de Fisher e, para as variáveis quantitativas, o teste t ou análise de variância (ANOVA), de acordo com o tipo de comparação.

Todas as análises foram realizadas nos softwares GraphPad Prism (versão 8.0.0) e Orange (versão 3.24.1), e um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

Tabela 2. Anticorpos e recuperação antigênica utilizados na imunohistoquímica

Anticorpo (Dako)	Diluição	Recuperação antigênica	Controle positivo	Padrão de marcação
E-caderina monoclonal de camundongo Clone NCH-38	1:100	Fogão (20 minutos)	Carcinoma previamente conhecido como positivo	Membrana celular
Receptor de estrógeno	Pré-diluído			Nuclear

monoclonal de camundongo (clone EP-1 )	Panela de Útero normal pressão (20 de cadela minutos)
---	---

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Animais e características clínicopatológicas

As características clínicas e patológicas de cães com CMTs, incluindo idade, status de castração, tamanho do tumor, graduação histológica e presença de metástases, estão listadas na Tabela 3. Cento e onze cadelas foram incluídas neste estudo, com idade média de  $10,07 \pm 3,08$  anos (intervalo: 4-12 anos). A idade média para cães com tumor maligno ( $n = 95$ ; 85,58%) forá de 10 anos e para cães com hiperplasia ( $n = 10$ ; 9,0%) ou tumor benigno ( $n = 6$ ; 5,4%) foi de 8 anos. A descrição da localização anatômica específica dos tumores pela glândula é apresentada na Tabela 3. A maior incidência ocorreu no par abdominal (35/105; 33,3%). Uma associação significativa foi encontrada entre a idade dos cães e o comportamento maligno de um tumor ( $p = 0,037$ ).

Quarenta e três (38,73%) dos 111 cães com CMTs eram mestiços, enquanto 61,26% (68/111) eram cães de raça pura, incluindo Poodle ( $n = 16$ ), Pinscher ( $n = 11$ ), Pitbull ( $n = 7$ ), Dachshund ( $n = 5$ ), Labrador Retriever ( $n = 4$ ), Dálmata ( $n = 3$ ), Cocker Spaniel ( $n = 3$ ), Pastor Alemão ( $n = 3$ ), Rottweiler ( $n = 3$ ), Yorkshire Terrier ( $n = 3$ ) e Shih Tzu ( $n = 2$ ). Beagle, Blue Heeler, Border Collie, Deutscher Boxer, Bull Terrier, Fila Brasileiro, Lhasa Apso e Maltês foram responsáveis por um dos 68 cães de raça pura com CMT's

Houve associação significativa entre cães pequenos de raça pura e neoplasia benigna ( $p = 0,01$ ) (Tabela 3). Os cães sem raça definida não foram incluídos devido à sua considerável variabilidade de tamanhos. Dos 68 cães de raça pura, 18 (26,5%) foram considerados cães de raça pequena, um dos quais foi excluído por ser um outlier. Tumores menores que 3 cm de diâmetro foram observados em 76,5% (13/17) dos cães pequenos de raça pura e 30% (15/50) nos demais cães de raça pura (Tabela 4). Houve associação significativa entre tumores menores que 3 cm e cães de raças pequenas ( $p = 0,0014$ ).

De 111 cadelas com CMTs, 3 (2,70%) foram castradas, enquanto 43 (38,75%) estavam inteiras. Para 65 cães (58,56%), os dados sobre a esterilização não foram registrados nas histórias de casos.

Tabela 3. Resultado da associação clínica e variáveis em relação ao tipo tumoral em cadelas.

Variáveis Clínicas	Freq. F. Absoluta (%)	Tipo tumoral <sup>2</sup>		Benigna		Maligna	
		Hiperplasia F. Absoluta (%)	p- valor	F. Absoluta (%)	p- valor	F. Absoluta (%)	p- valor
Idade*							
1 até 5 anos	08(7.21) – 4.88	1(12.5)	0.54	1(12.5)	0.36	6(75)	0.32
5 até 10 anos	57(51.4) – 8.33	7(12.3)	0.32	4(7.0)	0.67	46(80.7)	0.17
> 10anos	46(41.4) – 13.13	2(4.3)	0.19	1(2.2)	0.39	43(93.5)	0.05
Tamanho do tumor							
1 - 3cm	31(27.9 3)	01(3.2)	0.28	03(9.7)	0.34	27(87.1)	> 0.99
3 – 5cm	23(20.7 2)	01(4.35)	0.68	01(4.35)	> 0.99	21(91.3)	0.35
> 5cm	57(51.3 5)	08(14.03)	0.09	02(3.51)	0.42	47(82.46 )	0.42
Tamanho da raça** (n=68)							
Pequena	18(26.4 7)	1(5.55)	> 0.99	4(22.22)	0.01	13(72.23 )	0.11
Media	36(52.9 4)	4(11.11)	0.36	1(2.78)	0.17	31(86.11 )	> 0.99
Grande	14(20.5 9)	0(0)	0.57	0(0)	0.57	14(100)	0.10
Ulceração							
Presente	39(35.1 4)	02(5.13)	0.49	01(2.56)	0.20	36(92.3)	
Ausente	72(64.8 6)	08(11.12)	0.66	05(6.94)	0.66	59(81.94 )	0.16
OSH							
Sim	03(2.70)	0(0)	> 0.99	0(0)	> 0.99	03(100)	> 0.99
Não	43(38.7 5)	07(16.28)	0.04	04(9.3)	0.20	32(74.42 )	0.01
NI	65(58.5 6)	03(4,61)	0.08	02(3.08)	0.22	60(92.31 )	0.04
Localização							

Torácica	18(16.2 2)	01(5.56)	> 0.99	01(5.55)	0.39	16(88.89 )	> 0.99
Abdominal	35(31.5 3)	04(11.43)	0.72	01(2.86)	0.66	30(85.71 )	> 0.99
Inguinal	30(27.0 3)	03(10)	> 0.99	01(3.33)	> 0.99	26(86.67 )	> 0.99
Múltipla	22(19.2 2)	02(9.09)	> 0.99	03(13.64 )	0.09	17(77.27 )	0.30
NI	06(5.40)	0(0)	> 0.99	0(0)	> 0.99	06(100)	0.59
Linfonodo Metástase							
Sim	20(18.0 2)	0(0)		0(0)		20(100% )	
Não	91(81.9 8)	10(10.99)	0.20	06(6.59)	0.58	75(82.42 )	0.07

Obs. Toda estatística foi analisada utilizando teste exato de Fisher.

\* Na variação de idade, o meio termo de cada categoria foi incluído na coluna de frequência (freq)

\*\* Tamanho da raça (n = 68) apenas cinco raças foram mais prevalentes com TMC

O diâmetro máximo médio dos CMTs foi de  $5,90 \pm 4,35$  cm (variação: 0,6 a 19 cm). Dos 68 cães de raça pura, 18 (26,5%) eram considerados raças pequenas e tinham tumor de tamanho médio de  $2,78 \pm 2,3$  cm; trinta e seis (52,9%) eram raças de tamanho médio com tumor médio de  $5,23 \pm 3,6$  cm e 14 (20,6%) eram raças grandes com tumor médio de  $6,1 \pm 3,4$  cm. Os cães foram agrupados em três categorias com base no diâmetro máximo de seu tumor mamário: <3 cm (27,93%; 31/111), de 3 a 5 cm (20,72%; 23/111) e > 5 cm (51,35%; 57/111). Foi avaliado o tamanho máximo de um tumor em relação à classificação do tumor (hiperplasia, benigno ou maligno). O maior tamanho médio foi observado na hiperplasia ( $8,4 \pm 5,6$  cm), seguido dos tumores malignos ( $5,69 \pm 4,09$  cm) e benignos ( $3,78 \pm 3,59$  cm), respectivamente. O tamanho dos tumores mamários no grupo hiperplasia foi estatisticamente diferente ( $p = 0,025$ ) do tamanho do tumor nos grupos benigno e maligno. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a classificação do tumor (neoplasia, benigno ou maligno) e as variáveis clínicas (ulceração e metástase).

Tabela 4. Distribuição de casos classificados de acordo com o tamanho do tumor e raças pequenas comparado com os outros tamanhos.

Tamanho da raça	da N	Diâmetro do Tumor					
		< 3cm		3 – 5cm		> 5cm	
		Fr(%)*	Média±dp**	Fr(%)	Média±dp	Fr(%)	Média±dp

Pequena	17	13(76.5)	1.75±0.71	01(5.9)	3.5±0	03(17.6 )	7±2.45
Outros	50	15(30)	1.77±0.78	13(26)	4.15±0.56	22(44)	8.79±2.42
<i>p</i> Valor	0.0014		0.09		0.08		

OBS:

\*Frequência absoluta. Dentro da frequência relativa dos parênteses.

\*\*Média±dp (média e desvio padrão do diâmetro do tumor – cm).

De 111 cadelas com CMTs, 85,58% (n = 95) tinham um carcinoma maligno, 5,4% (n = 6) tinham um tumor benigno e 9,0% (n = 10) foram diagnosticados com hiperplasia mamária. O diagnóstico morfológico dos tumores mamários malignos foi: carcinoma complexo (29,47%; n = 28), carcinoma simples (25,26%; n = 24), carcinoma misto (22,11%; n = 21), carcinosarcoma (11,58%; n = 11), carcinoma sólido (9,47%; n = 9), carcinoma anaplásico (1,05%; n = 1) e carcinoma *in situ* (1,05%; n = 1). O número total de tumores malignos usados para subclassificação por graduação foi 95; quarenta e dois eram grau I, 31 eram grau II e 22 eram grau III. A Tabela 5 mostra a classificação histológica e graduação dos tumores mamários malignos.

Tabela 5. Associação entre tumores mamários malignos e sua graduação tumoral.

Maligno Tumor Mamário	Grau Histológico		
	I (n=42)	II (n=31)	III (n=22)
Simples carcinoma (n=24)	10	08	06
Carcinoma Sólido(n=9)	02	07	-
Carcinoma Misto (n=21)	10	10	01
Carcinoma Anaplásico (n=1)	-	-	01
Carcinoma Complexo (n=28)	20	06	02
Carcinosarcoma <i>In-situ</i> (n=1)	-	-	01
Carcinosarcoma (n=11)	-	-	11

#### 4.2 Estudo IHC

Dos 95 tumores malignos avaliados qualitativamente por IHC, 26,3% (25/95) foram positivos para ER (Fig. 1A), e 73,7% (70/95) foram negativos (Fig.

1B). A coloração de ER foi observada nos núcleos das células epiteliais tumorais. Além disso, 48,4% (46/95) foram positivos para E-caderina (Fig. 1C); 51,6% (49/95) foram negativos para este imunomarcador (Fig. 1D). A positividade da E-caderina foi indicada pela presença de coloração distinta da membrana da célula epitelial marrom-escura.

Na avaliação qualitativa (positiva e negativa) da marcação imunoistoquímica de ER e E-caderina em tumores malignos, houve associação estatisticamente significativa entre malignidade grau III e imunomarcagem negativa para estrogênio ( $p = 0,01$ ). As frequências absolutas e relativas do diagnóstico morfológico e o grau de malignidade em relação à imunomarcagem para ER e E-caderina são mostradas na Tabela 6.

Tabela 6. ER e E-caderina, expressão em tumores mamários malignos e sua correlação com grau histológico.

Tumor Maligno	Freq.	ER		<i>p</i> valor	E-cadherin		<i>p</i> valor
		Fr(%)			Fr (%)		
<i>Diagnóstico</i>	Fr (%)	+	-		+	-	
Carcinoma Simples	24 (25.26)	6(25)	18(75)	> 0.99	12(50)	12(50)	> 0.99
Carcinoma Sólido	9 (9.47)	3(33.3)	6(66.7)	0.69	3(33.3)	6(66.7)	0.48
Carcinoma Misto	21 (22.11)	7(33.3)	14(66.7)	0.41	12(57.1)	9(42.9)	0.46
Carcinoma Anaplásico	1 (1.05)	0(0)	1(100)	> 0.99	0(0)	1(100)	0.48
Carcinoma complexo.	28 (29.47)	9(32.1)	19(67.9)	0.44	14(50)	14(50)	> 0.99
Carcinoma In-situ	1 (1.05)	0(0)	1(100)	> 0.99	0(0)	1(100)	> 0.99
Carcinosarcoma	11 (11.58)	0(0)	11(100)	0.06	4(36.4)	7(63.6)	0.52
Subtotal	95	25(26.3)	70(73.7)	-	46(48.4)	49(51.6)	-
Grau Histológico	Fr (%)	+	-	<i>p</i> valor	+	-	<i>p</i> valor
I	42(44.21)	15(35.7)	27(64.3)	0.09	21(50)	21(50)	0.83
II	31(32.63)	9(29.1)	22(70.9)	0.80	17(54.8)	14(45.2)	0.51

III	22(23.16)	1(4.5)	21(95.5)	0.006	8(36.4)	14(63.6)	0.23
-----	-----------	--------	----------	-------	---------	----------	------

Toda estatística analisada foi realizada usando o teste exato de Fisher

Nenhuma associação significativa pôde ser estabelecida entre a classificação histológica (hiperplasia, benigna ou maligna) e a imunomarcagem para ER e E-caderina. Estudos histopatológicos revelaram que 21 (22,10%) de 95 tumores mamários malignos tiveram metástase. Destes, metástase de carcinoma simples (n = 9) foi significativamente associada com expressão negativa de ER (p = 0,03), e uma alta associação com imunomarcagem positiva para E-caderina (p = 0,0001). Além disso, foi observada uma associação significativa entre metástase de carcinoma misto e expressão positiva de E-caderina (p = 0,01) (Tabela 7).

Tabela 7. ER e E-caderina expressão e sua correlação com o tipo tumoral e metástase

Tipo Tumoral	Metastase Fr (%)	ER			E-caderina		
		Fr (%)	+	-	p valor	Fr (%)	+
Simple C.	7(7.4)	2(28.6)	5(71.4)	0.03	6(85.7)	1(14.3)	0.0001
Complexo C.	2(2.1)	1(50)	1(50)	0.08	1(50)	1(50)	0.29
Sólido C.	3(3.2)	1(33.3)	2(66.7)	0.12	2(66.7)	1(33.3)	0.06
Misto C.	4(4.2)	0(0)	4(100)	> 0.99	3(75)	1(25)	0.01
Anaplásico C.	1(1.0)	0(0)	1(100)	> 0.99	1(100)	0(0)	0.16
Carcinosarcoma	3(3.2)	0(0)	3(100)	> 0.99	1(33.3)	2(66.7)	0.41
Total	95	4	16	-	15	6	-

Os tumores mamários em relação à localização (glândula afetada) foram classificados em: abdominais (n = 35; 31,53%), inguinais (n = 30; 27,03%), múltiplos (n = 22; 19,22%) ou torácicos (n = 18 ; 16,22%); em seis casos (5,4%) não foi identificada a localização. Não houve associação estatisticamente significativa entre a localização da glândula afetada e E-caderina e ER IHC.

### 4.3 Tumores malignos

Foram 95 tumores malignos testados em IHQ. O tipo histológico predominante na avaliação desses, foi o carcinoma complexo (28/95, 28%), seguido pelo carcinoma em tumor misto (21/95, 22%) e então o carcinoma tubulopapilar (15/95, 15%) e carcinossarcoma (11/95, 11%). A idade dos cães que apresentaram esses padrões morfológicos foi de 4 a 16 anos de idade (média de 10 anos). A maioria dos cães, 70% (66/95) tinha acima de 8 anos de idade. A distribuição das principais características clínicas avaliadas segundo os subtipos de câncer de mama classificados pela imunohistoquímica é apresentada no Quadro 5. O tamanho médio dos tumores malignos foi de 5,07cm com amplitude entre 0,6 a 17cm.

## 5 Discussão

O presente estudo relata as características clinicopatológicas e imunohistoquímicas dos CMTs em 111 cães no centro-oeste de Mato Grosso, Brasil. Entre esses cães, 85,58% dos TMGs foram histologicamente classificados como malignos. Essa porcentagem é maior do que 40-50% de TMGs relatados como malignos em estudos realizados nos EUA (ALLEN SW et al., 2013), Canadá (MITCHEL L. et al., 1974) e México (SALAS Y. et al., 2015), mas semelhante às taxas relatadas na Índia (83%), Ásia (87,8%) e na região sul de Brasil (73,3%) (OLIVEIRA FILHO JC et al., 2010; DILEEPKUMAR K. et al., 2014; ARIYARATHNA H et al., 2018). As razões para a maior porcentagem de tumores mamários malignos em cães no presente estudo são desconhecidas, mas a exposição frequente de cães a carcinógenos e uma disposição reduzida dos proprietários em procurar atendimento veterinário devido a questões financeiras podem ser alguns dos fatores. Além disso, estudos baseados no envio de amostras a laboratórios tendem a ter maior prevalência de neoplasias malignas, uma vez que muitos nódulos mamários menores não são removidos cirurgicamente ou não são enviados aos laboratórios por veterinários e proprietários (MORRIS JS et al., 1998).

Os tumores mamários são o tipo de neoplasia mais comum em cadelas inteiras. Isso pode ser atribuído à promoção da carcinogênese mamária pela exposição prolongada dos tecidos mamários aos hormônios reprodutivos (DONNAY I ET AL., 1995). O ER foi reconhecido como um dos principais

impulsionadores da carcinogênese mamária em mulheres e cães (SORENMO KU ET AL., 2019). A duração da exposição aos hormônios ovarianos no início da vida determina o risco geral de câncer mamário (KRISTIANSEN VM ET AL., 2016). O risco de desenvolver TGM aumenta de 0,5% a 8% a 26%, dependendo se OHE é realizado antes do primeiro, segundo ou qualquer estro subsequente, respectivamente (ASHBECK EL ET AL 2007). Cães com tumores ER-positivos de grau II, ou com níveis aumentados de 17 $\beta$ -estradiol sérico peri-cirúrgico, representam o subconjunto de cães com carcinomas mamários com maior probabilidade de se beneficiar de OHE. No entanto, nem todos os cães com carcinoma mamário se beneficiam de OHE no momento da remoção do tumor (KRISTIANSEN VM ET AL., 2013). Isso é corroborado pela observação do presente estudo de que a maioria dos cães que desenvolveram tumores mamários malignos não foi submetida a OSH ( $p = 0,01$ ).

Foi observada associação positiva entre cadelas inteiras e alterações mamárias relacionadas à hiperplasia ( $p = 0,04$ ). Portanto, parece plausível que um subconjunto de cães com hiperplasia da glândula mamária possa estar em risco de desenvolver tumores malignos e, portanto, potencialmente fatais. Em comparação, mulheres com tumor benigno de mama ou hiperplasia mamária apresentam risco aumentado de desenvolver câncer de mama subsequentemente, e esse risco aumenta com o aumento da atipia (ASHBECK EL et al., 2007; KRISTIANSEN VM et al., 2013). Essas descobertas reforçam as semelhanças entre mulheres e cães em termos do papel da exposição hormonal e do risco de câncer mamário, em que os efeitos dos hormônios são contínuos e contribuem para o aumento do risco com o aumento da idade (KRISTIANSEM VM et al., 2016).

Os resultados do presente estudo demonstram uma relação clara que a raça canina mais afetada foi o Poodle. Isso está de acordo com os achados de Oliveira Filho et al. 2010, mas de maneira geral não há um consenso quanto à predisposição racial. Alguns autores relatam maior incidência em cães de caça (Pointer, Setter e Spaniel Breeton), enquanto outros descrevem altas frequências em raças com diferentes habilidades (BRODEY RS et al. 1983). Embora um componente genético não tenha sido avaliado neste estudo, certas raças de cães têm um risco aumentado de desenvolver TGMs porque a supressão tumoral do gene p53, o gene mutado com mais frequência em

tumores humanos, também foi identificada em CMTs (SORENMO K. 2003). Além disso, o oncogene c-erbB2 foi encontrado para ser superexpresso na maioria dos tumores mamários malignos caninos, e mutações em BCRA1 foram documentadas em alguns casos (SORENMO K. 2003). Foi identificada associação significativa ( $p = 0,037$ ) entre cães com 10 anos (85,6%) e desenvolvimento de tumor mamário maligno, sugerindo que a incidência de CMT aumenta com a idade. Em 76,5% dos CMTs neste estudo, os tumores de pequeno porte (<3 cm) foram predominantes em raças pequenas ( $p=0,0014$ ). Essas descobertas sugerem que a detecção precoce de uma massa palpável pelo dono de um cão durante exames físicos de rotina em raças pequenas pode contribuir para a maior taxa de tumores de pequeno porte (ITOH T et al., 2005). Além disso, os resultados mostraram que raças pequenas tendem a diagnóstico mais precoce e conseqüentemente, de neoplasia benigna, devido a contato maior com os donos, normalmente devido normalmente a convívio mais próximo ( $p = 0,01$ ), sugerindo que o tamanho do tumor é um fator prognóstico independente. Tumores <3 cm de diâmetro foram associados a um prognóstico significativamente melhor do que tumores >3 cm. Um fator interessante em relação ao tamanho do tumor observado no presente estudo foi que o tamanho médio dos tumores no grupo com hiperplasia mamária foi significativamente maior ( $p = 0,025$ ) do que nos tumores mamários benignos e malignos. Esses achados enfatizam que o tamanho do tumor por si só não confirmam a malignidade e a confirmação histológica é essencial, mas vale a ligação entre a evolução da hiperplasia x tamanho, com o o tempo, sendo esse, fator de risco, para desenvolvimento e evolução de um tumor maligno. Neste estudo, as glândulas mamárias abdominais e inguiniais foram os locais mais frequentes para o desenvolvimento do tumor; esse achado também foi observado por outros trabalhos (CAMERON AM et al., 1971; MISDORP W et al., 1971). As glândulas mais caudais são as maiores e mantêm a capacidade secretora por mais tempo do que outros pares, portanto, podem ter uma maior propensão para o desenvolvimento de tumor (FIDLER IJ & BRODEY RS, 1967).

Neste estudo observou-se associação significativa entre grau III carcinomas ( $p = 0,01$ ) e expressão negativa de ER. O desenvolvimento da maioria dos carcinomas da glândula mamária é estrogênio-dependente, e a maioria dos carcinomas mamários caninos expressa ERs (SONREMO K., 2003;

SCHNEIDER R. et al., 1969). Há uma relação inversa entre a expressão de ER e diferenciação histológica. Estudos anteriores mostraram que tumores benignos e bem diferenciados são mais propensos a ser ER-positivos, enquanto tumores indiferenciados e anaplásicos têm maior probabilidade de ser ER-negativos (NIETO A. et al., 2000), corroborando nossos resultados. Além disso, os tumores malignos tendem a perder sua dependência hormonal e tendem a ser negativos para ER. No presente estudo, a metástase de carcinoma simples foi significativamente associada a um perfil de ER negativo, indicando um pior prognóstico. Um relatório anterior mostrou, mais surpreendentemente, que níveis elevados de estrogênio no soro melhoraram significativamente o resultado em cães com tumores de alto risco, incluindo aqueles em estágio avançado e aqueles com um escore flexível alto (SONREMO K et al 2003).

Embora não tenha sido encontrada associação estatística entre a expressão da caderina-E e os tumores mamários malignos, 49 (51,6%) de 95 tumores mamários malignos apresentaram expressão negativa da caderina-E por IHQ. As caderinas são glicoproteínas transmembrana dependentes de cálcio responsáveis pela adesão célula-célula. Na medicina veterinária, como a maioria dos CMTs são de origem epitelial, uma expressão reduzida ou negativa de E-caderina está relacionada ao aumento da malignidade do tumor, agressividade da metástase e menor tempo de sobrevivência global (KASZAK I et al., 2018). Por outro lado, no presente estudo, a expressão positiva da E-caderina foi significativamente associada a metástases de dois tipos histológicos (carcinoma simples e carcinoma misto) de tumores mamários malignos em cães. No entanto, isso não é surpreendente porque a formação de as estruturas tubulares e papilares observadas no diagnóstico morfológico requerem algum grau de organização, que depende em grande parte das moléculas de adesão (caderinas e cateninas) (TAKEICHI M 1991; MATOS AJ et al 2006).

## **6 CONCLUSÃO**

Este estudo sugere que existe uma relação significativa entre a perda da expressão de ER e outros fatores conhecidos de mau prognóstico em CMTs, como grau histológico III e metástases em linfonodos. No entanto, estudos futuros são necessários para identificar fatores prognósticos que podem ajudar

alvos terapêuticos a apoiar um melhor resultado e melhorar a sobrevida, especialmente os níveis séricos de hormônios sexuais.

## 7 REFERÊNCIAS

ABDELMEGEED, S. M.; MOHAMMED, S. Canine mammary tumors as a model for human disease ( Review ). **Oncology Letters**, v. 15, n. 10.3892/ol.2018.8411, p. 8195–8205, 2018.

ABE-SANDES, K. et al. Câncer de mama triplo negativo e sua associação com ancestralidade africana. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 9, n. 1, p. 3–7, 2010.

ANDREASEN, E. B. et al. Expression of tissue factor in canine mammary tumours and correlation with grade, stage and markers of haemostasis and inflammation. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 14, n. 2, p. 191–201, 2014.

ARAÚJO, P. B. et al. Influência da neoplasia mamária na concentração sérica de hormônios e na expressão de receptores de estrógeno e progesterona em cadelas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 5, p. 949–956, 2018.

BERTON, C. R.; TERZIAN, A. C. B.; RUIZ, C. M. Fatores prognósticos e preditivos nas neoplasias mamárias – importância dos marcadores imunohistoquímicos nas espécies humana e canina – estudo comparativo comparative study. **Arquivo Ciências da Saúde**, v. 15, n. 4, p. 189–98, 2008.

BRØNDEN, L. B.; FLAGSTAD, A.; KRISTENSEN, A. T. Veterinary cancer registries in companion animal cancer: A review. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 5, n. 3, p. 133–144, 2007.

CANADAS-SOUSA, A. et al. Estrogen receptors genotypes and canine mammary neoplasia. **BMC Veterinary Research**, v. 15, n. 1, p. 1–10, 2019.

CANADAS, A. et al. Influence of E-cadherin genetic variation in canine mammary tumor risk, clinicopathological features and prognosis. **Veterinary and Comparative Oncology**, p. vco.12510, 2019.

CARVALHO, C. F. C. F. DE. Neoplasias mamárias dos carnívoros domésticos – Estudo retrospectivo. p. 72, 2012.

CASSALI, G. D. et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of

canine mammary tumors-2013. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 7, n. 2, p. 38–69, 2014.

CEROVŠEK, M. et al. Clinicopathological survey of 56 canine malignant mammary tumours in slovenia-prognostic value of clinical stage and histological grade. **Slovenian Veterinary Research**, v. 50, n. 3, p. 93–102, 2013.

CHOCTEAU, F. et al. Proposal for a Histological Staging System of Mammary Carcinomas in Dogs and Cats. Part 2: Feline Mammary Carcinomas. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, n. November, p. 1–13, 2019a.

CHOCTEAU, F. et al. Proposal for a Histological Staging System of Mammary Carcinomas in Dogs and Cats. Part 1: Canine Mammary Carcinomas. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, n. November, p. 1–12, 2019b.

DUARTE CINTRA, JR. et al. Perfil imuno-histoquímico e variáveis clinicopatológicas no câncer de mama. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 2, p. 178–187, 2012.

EGENVALL A. et al. 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**. v:69, n 1–2 p 109-127, 2005.

FADARE, O.; TAVASSOLI, F. A. Clinical and pathologic aspects of basal-like breast cancers. **Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine**, v. 5, n. 3, p. 149–159, 2008.

FERREIRA, E. et al. The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 7, n. 4, p. 230–235, 2009.

GAMA, A.; SCHMITT, F. Cadherin Cell Adhesion System in Canine Mammary Cancer: A Review. **Veterinary Medicine International**, v. 2012, p. 1–8, 2012.

GLASSMAN, D. et al. Adjuvant endocrine therapy for hormone-positive breast cancer, focusing on ovarian suppression and extended treatment: **An update. Anticancer research**, v. 37, n. 10, p. 5329- 5341, 2017

GOLDSCHMIDT, M. H. et al. Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 117–131, 2011.

GOLDSTEIN, N. S. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 16, p. 2784–2795, 2010.

GUERRA, M. R. et al. Sobrevida de cinco anos e fatores prognósticos em coorte de pacientes com câncer de mama assistidas em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. 11, p. 2455–2466, 2009.

GUPTA, A.; DESHPANDE, C. G.; BADVE, S. Role of E-cadherins in development of lymphatic tumor emboli. **Cancer**, v. 97, n. 9, p. 2341–2347, 2003.

HUGHES, K.; DOBSON, J. M. Prognostic histopathological and molecular markers in feline mammary neoplasia. **Veterinary Journal**, v. 194, n. 1, p. 19–26, 2012.

KASZAK, I. et al. Current biomarkers of canine mammary tumors. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 60, n. 1, p. 1–13, 2018.

KNUDSEN, K. A.; WHEELLOCK, M. J. Cadherins and the mammary gland. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 95, n. 3, p. 488–496, 2005.

LOPES, L. M.; VARALLO, G. R. Avaliação da incidência da metástase pulmonar em cadelas portadoras de câncer de mama. **Revista Científica de Medicina Veterinária - UNORP**, v. 1, n. 2, p. 23–34, 2017.

LUU, S. et al. Connexin 26 and Connexin 43 in canine mammary carcinoma. **Veterinary Sciences**, v. 6, n. 4, 2019.

MÁRIO, D. et al. UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA Faculdade de Medicina Veterinária ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E ANATOMO-PATOLÓGICO DE TUMORES MAMÁRIOS NA CADELA E NA GATA MÓNICA MENDES COSTA CONSTITUIÇÃO DO JÚRI ORIENTADOR. 2010.

MARTÍN DE LAS MULAS, J.; MILLÁN, Y.; DIOS, R. A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor  $\alpha$  and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 2, p. 200–212, 2005.

MATOS, A. J. F. et al. E-cadherin Expression in Canine Malignant Mammary Tumours: Relationship to Other Clinico-Pathological Variables. **Journal of Comparative Pathology**, v. 134, n. 2–3, p. 182–189, 2006.

MELO E SILVA, D. DE; SADDI, V. A.; MOMOTUK, E. G. Marcadores moleculares associados ao câncer de mama não metastático. **Rev. bras. cancerol**, v. 48, n. 1, p. 39–48, 2002.

MERLO DF, ROSSI L, PELLEGRINO C, CEPPI M, CARDELLINO U, CAPURRO C, RATTO A, SAMBUCCO PL, SESTITO V, TANARA G, B. V. Cancer Incidence in Pet Dogs: Findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. **J Vet Internal Medicine**, v. 22, p. 976–984, 2008.

OESTERREICH, S. et al. Advances in Brief Estrogen-mediated Down-Regulation of E-cadherin in Breast Cancer Cells 1. **Molecular and Cellular Biology**, v. 0133, n. 713, p. 5203–5208, 2003.

OLIVEIRA FILHO, J. C. et al. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 177–185, 2010.

PAREDES, J. C. DE A. F. et al. Correlação entre as expressões de P-caderina e de receptores de estrógeno no câncer da mama. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n. 4, p. 307–313, 2006.

PIEKARZ, C. H. et al. Expressão das caderinas nos tumores mamários em cadelas ( Cadherin Expression in Canine Mammary Tumors ). **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n. 1, p. 13–21, 2008.

QUEIROGA, F. L. et al. Exploring new biomarkers in the tumour microenvironment of canine inflammatory mammary tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 15, n. 2, p. 655–666, 2016.

QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos – Novas perspectivas. **Congresso de Ciências Veterinárias**, v. 3, p. 183–190, 2002.

RAPOSO, T. P. et al. Tumour-associated macrophages are associated with vascular endothelial growth factor expression in canine mammary tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 13, n. 4, p. 464–474, 2015.

SALAS, Y. et al. Epidemiological study of mammary tumors in female dogs

diagnosed during the period 2002-2012: A growing animal health problem. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–15, 2015.

SARLI, G. et al. Prognostic value of histologic stage and proliferative activity in canine malignant mammary tumors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 14, n. 1, p. 25–34, 2002.

TORÍBIO, J. M. DE M. L. et al. Caracterização clínica, diagnóstico histopatológico e distribuição geográfica das neoplasias mamárias em cadelas de salvador, Bahia. **Revista Ceres**, v. 59, n. 4, p. 427–433, 2012.

UYAMA, R. et al. Establishment of four pairs of canine mammary tumour cell lines. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 4, n. 2, p. 104–113, 2006.

VARALLO, G. R. et al. Global gene expression profile in canine mammary carcinomas. **Veterinary Journal**, v. 254, p. 105393, 2019.

WERNER, B. et al. Uso prático da imuno-histoquímica em patologia cirúrgica Practical use of immunohistochemistry in surgical pathology. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, Vol 41, Iss 5, Pp 353-364 (2005)**, v. 41, n. 5, p. 353–364, 2005.

YAGER, J. D.; DAVIDSON, N. E. Estrogen carcinogenesis in breast cancer *N Engl J Med* 354 (3): 270–282. **Find this article online**, p. 270–282, 2006.

ZHANG, H. et al. Establishment and characterization of a new triple-negative canine mammary cancer cell line. **Tissue and Cell**, v. 54, n. October 2017, p. 10–19, 2018.

## 8 APÊNDICE A – ARTIGO CIENTÍFICO

### Correlação clínico patológica entre as imunomarcações de E-caderina e receptores de estrógeno nos tumores de mama em cadelas<sup>1</sup>

Maria T.B. Ens<sup>2</sup>, Camila G. Campos<sup>3</sup>, Marina R. Fiori<sup>2</sup>, Asheley H. B. Pereira<sup>3</sup>, Fabiola A. Bonete<sup>2</sup>, Luiz D. C. Junior<sup>2</sup>, Marcos de A. Souza· Roberto L. de Souza<sup>2</sup> and Caroline A. Pescador<sup>3</sup>

**ABSTRACT.-** Ens M.T.B., Campos C.G., Fiori M.R., Pereira A.B.H., Bonete F.A., Junior L.D.C, Pescador C.A. & Souza R.L. 2019. **Correlação clínico patológica entre as imunomarcações de E-caderina e receptores de estrógeno nos tumores de mama em cadelas.** *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório de Patologia Veterinária, Universidade Federal do Mato Grosso, Av. Fernando Corrêa da Costa, 2367 - Boa Esperança, Cuiabá, MT 78060-900, Brazil. E-mail: [carolpescador@yahoo.com.br](mailto:carolpescador@yahoo.com.br)

The considerable increase of tumor diagnoses in animals affected by congenital anomalies should evolve after the necessity of a therapy for the prevention of the disorder. E-cadherin and estrogen expression levels were published through immunohistochemistry in bitches with breast neoplasms correlated with their clinical characteristics. The analysis of 111 cases of lymphoma and female, 95 were malignant and 16 benign, all had fragments of lymph node and were in paraffin and were created by HE. initially. All patients evolved, passed the telephone route for evaluation of survival according to the diagnosis data. This first moment made an evaluation only of the negative expressions in immunohistochemistry, since they are of two marks as markings. The malignant tumor may become a major cause for the diagnosis of case carcinoma and 35/95 present ulceration. Among patients with a negative diagnosis for E2 (80/95), symptoms of higher frequency were found in cases where the tumors were above 5 cm (38/80), without lymph node metastasis (63/80), above 8 years (56/80). Benign tumors were decorated in 16 samples (15%). The predominant histological subtype was hyperplasia (10/16, 64%). Among the patients with a negative diagnosis for E2 (14/16), symptoms of higher frequency were found in cases in which the tumors were above 5 cm (8/14), between 2 and 8 years (9/14) with mean of 8 years. Among patients with poor relationship with E-cadherin (8/17), cases of higher frequency were found in cases where tumors were present with a mean size of 7cm (4/8 T3) and mean age in 8 years. In order to evaluate the positive assessment scores for most variables and the observations as worse prognoses.

INDEX TERMS: Immunohistochemistry, female dogs, mammary, tumors, prognosis.

---

<sup>1</sup> Received on .....

Accepted for publication on .....

<sup>2</sup> Departamento de Clínica Cirúrgica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil\*Corresponding author: [carolpescador@yahoo.com.br](mailto:carolpescador@yahoo.com.br)

<sup>3</sup>Laboratório de Patologia Veterinária (LPV), Hospital Veterinário (HOVET), Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT). Av. Fernando Corrêa da Costa, 2367 - Boa Esperança, Cuiabá, MT 78060-900, Brasil.

**RESUMO.- [Correlação clínico patológica entre as imunomarcações de E-caderina e receptores de estrogênio nos tumores de mama em cadelas.]**

O aumento considerável de diagnósticos tumorais em animais de companhia apenas cresce ano após ano, necessitando então a realização de uma preconização tanto no momento do diagnóstico, como para seu tratamento e diretrizes para acompanhamento. Foi avaliado níveis de expressão de E-caderina e estrogênio, através da imunohistoquímica em cadelas com neoplasmas mamários correlacionando com suas características clínicas. Foi realizado através de estudo retrospectivo entre os anos de 2015 até junho de 2018. Foram acolhidos para análise 111 amostras de cães do sexo feminino sendo 95 malignos e 16 benignos, todos possuíam fragmentos de linfonodo e estavam já em parafina e que foram analisados por HE inicialmente. Todos os pacientes avaliados, passaram por questionário via telefonema para avaliação de sobrevivência de acordo com a data do diagnóstico. Nesse primeiro momento fez a avaliação apenas das expressões negativas na imunohistoquímica, uma vez que necessita de score ambas as marcações. Para os tumores malignos observou-se maior incidência para diagnóstico de Carcinoma Complexo (28/95), a raça mais acometida foi a SRD com 37/95 dos casos e 35/95 apresentavam ulceração. Entre os pacientes com expressão negativa para E2 (80/95), foram identificados picos de maior frequência nos casos onde os tumores apresentavam-se acima de 5cm(38/80), sem metástase em linfonodo(63/80), acima de 8 anos (56/80). Os tumores benignos foram analisados em 16 amostras (15%). O subtipo histológico predominante foi a hiperplasia (10/16, 64%). Entre os pacientes com expressão negativa para E2 (14/16), foram identificados picos de maior frequência nos casos onde os tumores apresentavam-se acima de 5cm(8/14), entre 2 e 8 anos (9/14) com média de 8 anos. Entre os pacientes com expressão negativa para E-caderina (8/17) foram identificados picos de maior frequência nos casos onde os tumores apresentavam-se com tamanho em média de 7cm (4/8 T3) e média de idade em 8 anos. Concluindo-se a necessidade ainda da avaliação dos scores de marcação positiva para correlação com maior precisão das variáveis já observadas como piores prognósticos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: imunohistoquímica, cães fêmeas, mama, tumor, prognóstico.

**INTRODUCTION**

Em medicina veterinária, os tumores mamários são as neoplasias de maior incidência em cadelas não castradas, sendo 50% delas de origem maligna(Martín De Las Mulas et al. 2005). Assim como em humanos, o câncer mamário canino tem comportamento biológico variável que dificulta as estimativas dos resultados clínicos individuais com base em suas características histológicas e clínicas (Misdorp et al. 1999).

Histologicamente, os tumores mamários são classificados como tumores epiteliais malignos, tipos especiais de tumores epiteliais, tumores malignos mesenquimais, carcinossarcoma e tumores benignos (Goldschmidt et al. 2011). O tipo de tumor mais comum entre eles é o carcinoma tubular (adenocarcinoma), seguido por carcinoma papilar, carcinoma sólido, carcinoma complexo e carcinossarcoma e os tumores mamários benignos são principalmente fibroadenomas, papilomas ductais, tumores mistos benignos e adenomas simples(Salas et al. 2015).

Levando em consideração a população canina e a alta incidência de tumores mamários nessa espécie, a doença pode ser considerada um grande problema na saúde animal, exigindo alternativas diagnósticas e terapêuticas (Salas et al. 2015). Existem alguns fatores prognósticos reconhecidos e bem aceitos dos tumores mamários malignos do cão, como pleomorfismo nuclear e celular, índice mitótico, presença de áreas de necrose, invasão peritumoral e linfática e metástase em linfonodos regionais (Goldschmidt et al. 2011). No câncer de mama canino, a expressão de biomarcadores de E-caderina e do receptor de estrogênio (RE) tem sido associada à progressão do tumor mamário (Gama & Schmitt 2012) e atualmente influencia o valor prognóstico. As caderinas são glicoproteínas transmembrana dependentes de cálcio e responsáveis por aderências célula-célula (Matos et al. 2006). Sua função é manter a estrutura normal de um tecido. Entre as caderinas, existem E-P e N-caderina. A caderina mais frequentemente avaliada é a E-caderina, que está envolvida na adesão celular epitelial (Matos et al., 2006). Acredita-se que a ruptura da adesão célula-célula normal resulte em deiscência de células tumorais, que é um passo inicial essencial no início da invasão e da metástase (Gupta et al. 2003). Além disso, elas estão também envolvidas na regulação de processos observados no desenvolvimento tumoral, como crescimento celular desordenado, diferenciação celular defeituosa e organização tecidual alterada (Andreasen et al. 2014). Como a maioria dos tumores de mama em humanos e em cães é de origem epitelial, as E-caderinas têm sido intensamente estudadas em relação à sua função na gênese do tumor (Matos et al. 2006). Estudos utilizando culturas celulares e modelos de animais sugeriram que as E-caderinas podem atuar também como molécula supressora de tumor e de invasão neoplásica (Piekarz et al. 2008). Desta forma, como

mediadoras de adesão intercelular, as E-caderinas impedem que as células de um tumor primário se soltem e invadam locais próximos ou distantes (Knudsen & Wheelock 2005).

Portanto, um fator facilitador da disseminação das células tumorais é a redução da expressão destas moléculas (Gama & Schmitt 2012). Baseando-se nisso, é sugerido que a redução ou a ausência de expressão de E-caderinas nos tumores possa servir como um indicador de prognóstico ruim, podendo ser um pré-requisito para a ocorrência da disseminação das células tumorais (metástase) (Piekarz et al. 2008).

Os receptores de esteróides puderam provar sua utilidade caracterizando subgrupos com prognóstico diferente entre cadelas com câncer mamário (Ferreira et al. 2009). No entanto, a maioria dos dados disponíveis era baseada na medição de receptores de esteróides usando citosol tumoral na qual é caro e há necessidade de condições especiais de armazenamento de amostras de tecido, não sendo viável na prática clínica. Com o desenvolvimento de anticorpos monoclonais anti-receptores nucleares de estrogênio e progesterona, a mensuração destes receptores através da imunohistoquímica (IHC) tornou-se cada vez mais importante. O receptor de estrogênio (RE) é considerado um dos mais importantes biomarcadores em tumores caninos mamários (TCM). E embora seja encontrado em tecido mamário normal, em crescimento e desenvolvimento, a maioria dos TCM (benignos e malignos) expressam RE (Kaszak et al. 2018). Em humanos, tumores mamários com baixa expressão de estrogênio e progesterona não são sensíveis à terapia endócrina, sendo classificados com prognóstico ruim. Enquanto que, tumores de mama com alta expressão de estrogênio e progesterona apresentam resultados clínicos ligeiramente melhores (Goldstein et al. 2010). Em cães, alguns estudos desmostraram que a expressão de receptor de estrogênio (RE+) em tumores mamários, foi encontrada mais frequentemente em tumores benignos, sendo relacionado assim a um bom prognóstico. Adicionalmente, tumores caninos mamários com expressão negativa de RE obtiveram prognóstico desfavorável (Araújo et al. 2018).

Diante disso, este estudo tem como objetivo relatar os achados clínico-patológicos de cadelas com tumores mamários atendidas no Hospital Veterinário (HOVET) da UFMT e correlacionar os padrões morfológicos encontrados com as expressões de E-caderina e receptor de estrogênio (ER) através da imunohistoquímica.

## MATERIALS AND METHODS

**População de estudo.** Foi realizado um estudo retrospectivo de neoplasmas mamários em cadelas, entre os anos de janeiro de 2015 até junho de 2018, diagnosticados pelo Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso (LPV-UFMT), campus Cuiabá. Todos os casos eram provenientes de biópsias, por incisão cirúrgica, realizadas no Hospital Veterinário da UFMT (Hovet-UFMT). Consideraram-se os diagnósticos morfológicos que constavam nos protocolos originais, buscando apenas quando necessário a padronização dos critérios escolhidos neste estudo através das classificações histomorfológicas conforme preconizado pela Organização Mundial de Saúde - *Armed Forces Institute of Pathology* (OMS-AFIP) (Misdorp et al. 1999). Foram considerados como “tumores mamários” todos os distúrbios do crescimento da glândula mamária, tanto os neoplásicos (compreendendo neoplasmas benignos e malignos) como os não-neoplásicos (compreendendo as alterações hiperplásicas) (Toríbio et al. 2012).

Foram consideradas, para o estudo, as seguintes variáveis: espécie (apenas canino), raça, sexo (fêmeas) idade ao diagnóstico, tamanho do tumor (em centímetros, caracterizado até 3cm – T1, de 3cm até 5cm – T2, acima de 5cm- – T3 (Oliveira Filho et al. 2010, Cerovsek et al. 2013), em casos de tumores multicêntricos, considera-se o maior tumor como tumor primário; tipo histológico; comprometimento de linfonodos inguinais, enviados pela biópsia pós cirurgia analisados por HE (com ou sem metástase); estágio de vida e expressão positiva para marcadores de estrogênio e expressão positiva de e-caderina e suas respectivas graduações através de imunohistoquímica.

**Critério de inclusão ou exclusão de casos.** Os pacientes caninos foram elegíveis para inclusão quando na busca ativa (coleta de dados manual) nos livros de registro e dos laudos histopatológicos de biópsias do LPV-UFMT e das fichas clínicas dos pacientes atendidos no Hospital Veterinário (HOVET), constavam diagnósticos morfológicos de neoplasias mamárias benignas, malignas e ou ambas em um mesmo caso; porém considerado o neoplasma mais agressivo, o animal foi tratado apenas por cirurgia (sem quimioterapia ou radioterapia pré ou pós mastectomia); e apresentassem nas suas respectivas fichas o contato do seu proprietário e dados clínicos completos. Inicialmente, foram identificados N=748 casos de neoplasias mamárias, incluso benignos e malignos, de cães e gatos, fêmeas e machos assistidos. Os critérios de exclusão incluíram: pacientes com números telefônicos inexistentes, não sendo possível realizar contato para estabelecer estágio de vida, casos que não possuíam mais fichas no arquivo, machos de cães e gatos

foram excluídos, bem como gatos do sexo feminino. Um total de 111 cadelas com tumores mamários foram incluídos neste estudo para análise de IHQ.

**Tempo de sobrevida.** O início do tempo de sobrevida foi considerado como a data do diagnóstico da doença (data de liberação do laudo histopatológico). Para a análise de sobrevida, foram considerados os óbitos ocorridos até o final do seguimento do estudo (junho de 2018), em decorrência do neoplasma de mama ou senilidade. Através de questionários por contato telefônico com o tutor. Não foram realizados necropsias nos pacientes assistidos.

### CONCLUSÃO

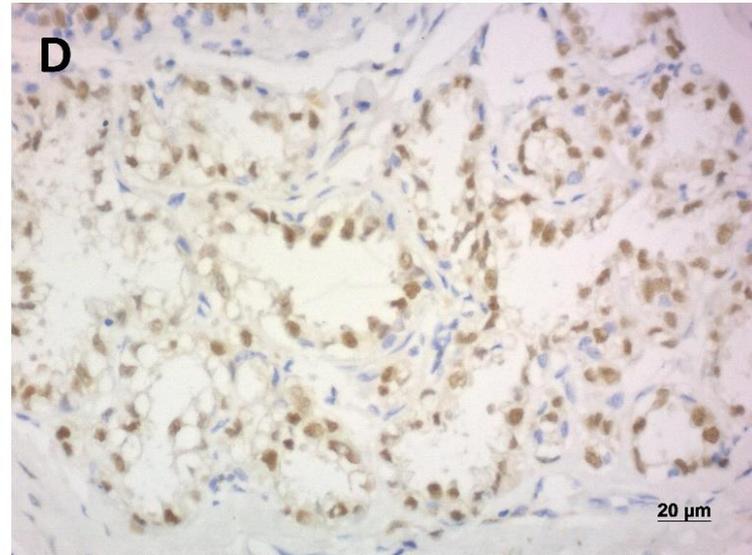
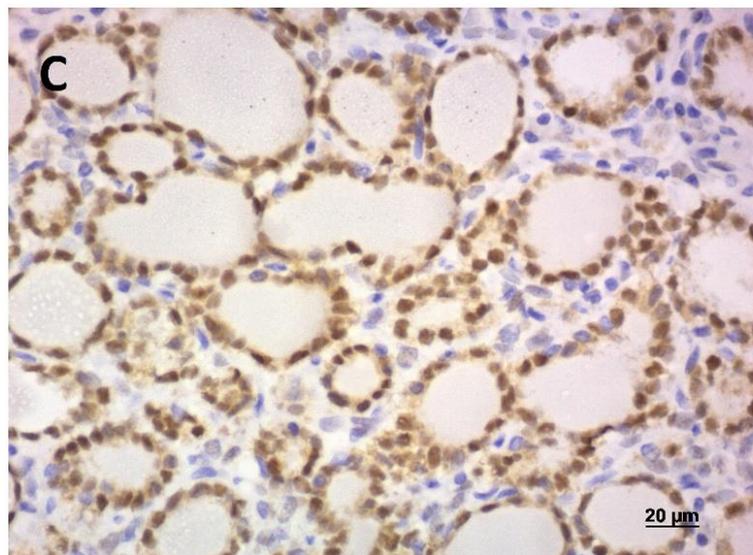
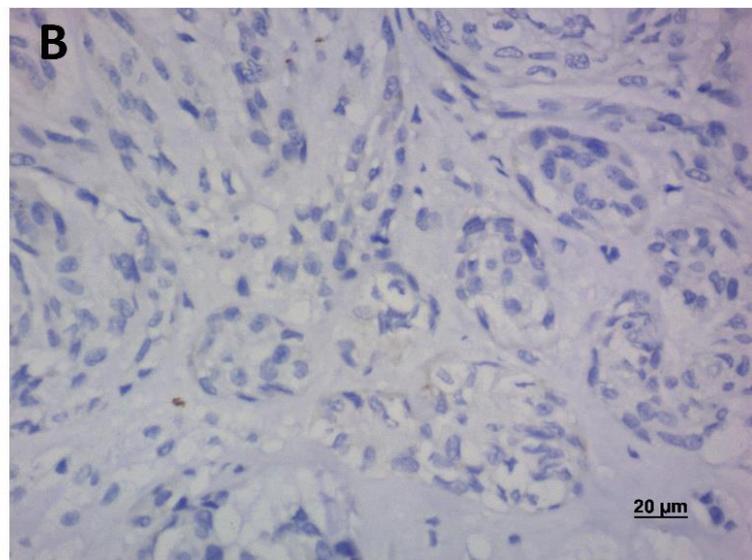
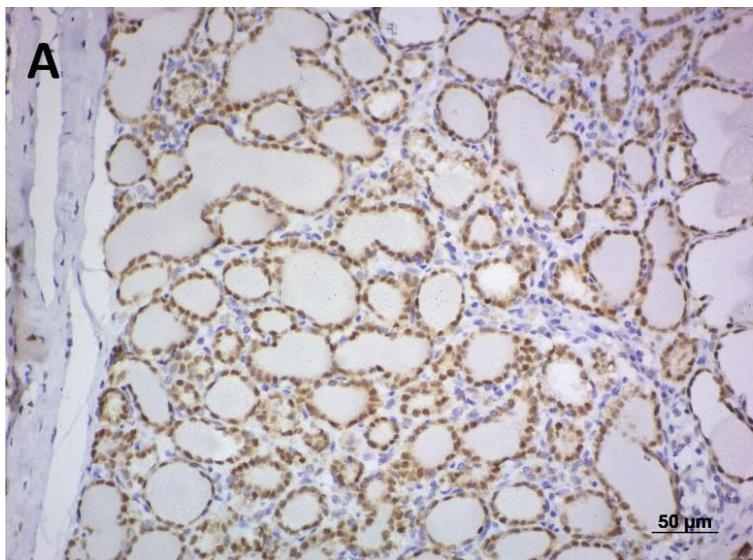
Devido a não realização dos escores de estrogênio e E-caderina, passando para a segunda parte da confecção desse artigo por completo, torna-se incompleto resultados para melhores discussões para com os que são publicados. Porém é perceptível já a alta taxa de óbito com variáveis clínicas já citadas e principalmente a importância desses, para com as marcações em análises imunohistoquímicas, que ainda são um desafio para medicina veterinária devido o alto custo e a própria padronização para os casos. Nota-se a importância da continuidade de análises tumorais com essa metodologia de diagnóstico para melhor prognóstico e tratamento terapêutico do paciente.

### REFERÊNCIAS

- Andreasen E.B., Kristensen A.T., Knudsen T., Nielsen O.L. & Tranholm M. 2014. Expression of tissue factor in canine mammary tumours and correlation with grade, stage and markers of haemostasis and inflammation. *Vet Comp Oncol.* 14(2):191-201. doi:10.1111/vco.12089
- Araújo P.B., Pereira-Campinho D.S., Silva DMF, et al. 2018. Influência da neoplasia mamária na concentração sérica de hormônios e na expressão de receptores de estrogênio e progesterona em cadelas. *Pesqui Veterinária Bras.* 38(5):949-956. doi:10.1590/1678-5150-pvb-5385
- Berton C.R., Terzian A.C.B. & Ruiz C.M. 2008. Fatores prognósticos e preditivos nas neoplasias mamárias – importância dos marcadores imuno-histoquímicos nas espécies humana e canina – estudo comparativo comparative study. *Arq Ciências da Saúde.* 15(4):189-198. doi:530015
- Cassali G.D., Lavalle G.E., Ferreira E, et al. 2014. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors-2013. *Brazilian J Vet Pathol.* 7(2):38-69. doi:10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2018.135084
- Cerovšek M., Plavec T., Zrimšek P., Pogačnik M. & Zabavnik J. 2013. Clinicopathological survey of 56 canine malignant mammary tumours in slovenia-prognostic value of clinical stage and histological grade. *Slov Vet Res.* 50(3):93-102
- Ferreira E., Bertagnolli A.C., Cavalcanti M.F., Schmitt F.C. & Cassali G.D. 2009. The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. *Vet Comp Oncol.* 7(4):230-235. doi:10.1111/j.1476-5829.2009.00193.x
- Gama A. & Schmitt F. 2012. Cadherin Cell Adhesion System in Canine Mammary Cancer: A Review. *Vet Med Int.* 2012:1-8. doi:10.1155/2012/357187
- Goldschmidt M.H, Peña L. & Rasotto R, Zappulli V. 2011. Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet Pathol.* 48(1):117-131. doi:10.1177/0300985810393258
- Goldstein N.S., Hagerty K.L. & Wolff AC, 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. *J Clin Oncol.* 28(16):2784-2795. doi:10.1200/jco.2009.25.6529
- Gupta A., Deshpande C.G. & Badve S. 2003. Role of E-cadherins in development of lymphatic tumor emboli. *Cancer.* 97(9):2341-2347. doi:10.1002/cncr.11332
- Kaszak I., Ruszczak A., Kanafa S., Kacprzak K., Król M. & Jurka P. 2018. Current biomarkers of canine mammary tumors. *Acta Vet Scand.* 60(1):1-13. doi:10.1186/s13028-018-0417-1

- Knudsen K.A. & Wheelock M.J. 2005. Cadherins and the mammary gland. *J Cell Biochem.* 95(3):488-496. doi:10.1002/jcb.20419
- Martín De Las Mulas J., Millán Y. & Dios R. 2005. A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor  $\alpha$  and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. *Vet Pathol.* 42(2):200-212. doi:10.1354/vp.42-2-200
- Matos A.J.F., Lopes C., Carvalheira J., Santos M., Rutteman G.R. & Gärtner F. 2006. E-cadherin Expression in Canine Malignant Mammary Tumours: Relationship to Other Clinico-Pathological Variables. *J Comp Pathol.* 134(2-3):182-189. doi:10.1016/j.jcpa.2005.10.004
- Merlo D.F., Rossi L., Pellegrino C., Ceppi M., Cardellino U., Capurro C., Ratto A., Sambucco P.L., Sestito V. & Tanara G.BV. 2008. Cancer Incidence in Pet Dogs: Findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. *J Vet Intern Med.* 22:976-984. doi:10.1111/j.1939-1676.2008.0133.x
- Misdorp W., Else R.W., Hellmén E. & Lipscomb T.P. 1999. Histological classification of the mammary tumors of the dog and the cat. World Health Organization. International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals. Second Series. WHO, Geneva, Switzerland. 7:11-58.
- Oesterreich S., Deng W., Jiang S., et al. 2003. Advances in Brief Estrogen-mediated Down-Regulation of E-cadherin in Breast Cancer Cells 1. *Mol Cell Biol.* 0133(713):5203-5208.
- Oliveira Filho, J.C., Kommers, G.D., Masuda, E.K. et al. 2010. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. *Pes. Vet. Bras.* 30(2):177-185. 10.1590/S0100-736X2010000200014
- Paredes, J.C.D.F., Leitão, D.R.A., Athanazio, D.A. et al 2006. Correlação entre as expressões de P-caderina e de receptores de estrógeno no câncer da mama. *J. Bras. de Patol. e Med. Lib.* 38(4):307-313
- Piekarz C.H., Biondo A.W., Amorim R.L., Rodaski S., Barros Filho I.R. & De Nardi Ab. 2008. Expressão das caderinas nos tumores mamários em cadelas (Cadherin Expression in Canine Mammary Tumors). *Arch Vet Sci.* 13(1):13-21. doi:ISSN 1517-784X
- Queiroga F. & Lopes C. 2002. Tumores mamários caninos – Novas perspectivas. *Congr Ciências Veterinárias.* 3:183-190
- Salas Y., Márquez A., Diaz D. & Romero L. 2015. Epidemiological study of mammary tumors in female dogs diagnosed during the period 2002-2012: A growing animal health problem. *PLoS One.* 10(5):1-15. doi:10.1371/journal.pone.0127381
- Sarli G., Preziosi R., Benazzi C., Castellani G. & Marcato P.S. Prognostic value of histologic stage and proliferative activity in canine malignant mammary tumors. 2002. *J Vet Diagnostic Investig.* 14(1):25-34. doi:10.1177/104063870201400106
- Toríbio J.M. de M.L., Lima A.E., Filho E.F.M., et al. 2012. Caracterização clínica, diagnóstico histopatológico e distribuição geográfica das neoplasias mamárias em cadelas de salvador, Bahia. *Rev Ceres.* 59(4):427-433. doi:10.1590/S0034-737X2012000400001
- Uyama R., Nakagawa T., Hong S., Mochizuki M. & Nishimura R. 2006. Establishment of four pairs of canine mammary tumour cell lines. *Vet Comp Oncol.* 4(2):104-113. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/vco.12510>.

Fig.1. Marcação para expressão de estrógeno. Canino. Mama. A- Carcinoma complexo em mama, marcações de intensidade forte; B- Canino. Mama. Carcinossarcoma, negativo para estrógeno; C- Canino. Carcinoma Complexo. Detalhes da marcação nuclear. D- Canino. Mama. Carcinoma em Tumor Misto com marcações menos intensas em núcleo celular.



**9 APÊNDICE B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO****Histopathology and Immunohistochemical Determination of Oestrogen Receptor and E-cadherin in Canine Mammary Tumours**

Journal:	<i>Veterinary and Comparative Oncology</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Keywords:	biomarkers, clinicopathological features, female dogs, mammary cancer, Pathology

SCHOLARONE™