

GUSTAVO MEIRELLES RIBEIRO

**CARCINOMA EM TUMOR MISTO DA MAMA DA CADELA:
AVALIAÇÃO DE ASPECTOS MORFOLÓGICOS E PERFIL
IMUNOFENOTÍPICO.**

Belo Horizonte

2010

GUSTAVO MEIRELLES RIBEIRO

**CARCINOMA EM TUMOR MISTO DA MAMA DA CADELA:
AVALIAÇÃO DE ASPECTOS MORFOLÓGICOS E PERFIL
IMUNOFENOTÍPICO.**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Patologia da Faculdade de Medicina da
Universidade Federal de Minas Gerais, como parte
dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.**

Área de concentração: Patologia Geral

**Orientador: Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali
Co-orientadora: Prof. Dra. Angélica Cavalheiro Bertagnolli**

**Belo Horizonte
Faculdade de Medicina da UFMG
2010**



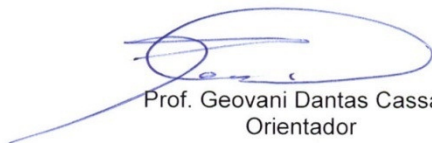
FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190/sala 533
Belo Horizonte – MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
cpg@medicina.ufmg.br

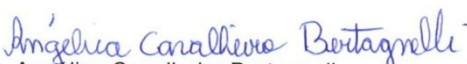


DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos professores doutores: Geovani Dantas Cassali, Angélica Cavalheiro Bertagnoli, Helenice Gobbi e Gleidice Eunice Lavalle, aprovou a defesa da dissertação intitulada: **“CARCINOMA EM TUMOR MISTO DA MAMA DA CADELA: AVALIAÇÃO DE ASPECTOS MORFOLÓGICOS E PERFIL IMUNOFENOTÍPICO”**, apresentada pelo mestrando **GUSTAVO MEIRELLES RIBEIRO** para obtenção do título de Mestre em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia - Área de Concentração em Patologia Geral da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 26 de maio de 2010.



Prof. Geovani Dantas Cassali
Orientador



Profa. Angélica Cavalheiro Bertagnoli
Coorientadora



Profa. Helenice Gobbi



Profa. Gleidice Eunice Lavalle



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190/sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
cpg@medicina.ufmg.br



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de **GUSTAVO MEIRELLES RIBEIRO**, nº de registro 2008652658. Às quinze horas do dia **vinte e seis do mês de maio de dois mil e dez**, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG, a Comissão Examinadora de dissertação indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **"CARCINOMA EM TUMOR MISTO DA MAMA DA CADELA: AVALIAÇÃO DE ASPECTOS MORFOLÓGICOS E PERFIL IMUNOFENOTÍPICO"**, requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia - Área de Concentração em Patologia Geral. Abrindo a sessão, o Presidente da comissão, Prof. Geovani Dantas Cassali, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a comissão se reuniu sem a presença do candidato e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Geovani Dantas Cassali/ Orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>apro</u>
Profa. Angélica Cavalheiro Bertagnoli/Coorientadora	Instituição: UFMG	Indicação: <u>apro</u>
Profa. Helenice Gobbi	Instituição: UFMG	Indicação: <u>apro</u>
Profa. Gleidice Eunice Lavalle	Instituição: UFMG	Indicação: <u>apro</u>

Pelas indicações, o candidato foi considerado APROVADO.

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da comissão examinadora. Belo Horizonte, 26 de maio de 2010.

Prof. Geovani Dantas Cassali/ Orientador [assinatura]
Profa. Angélica Cavalheiro Bertagnoli/Coorientadora Angélica Cavalheiro Bertagnoli
Profa. Helenice Gobbi [assinatura]
Profa. Gleidice Eunice Lavalle Gleidice Eunice Lavalle
Prof. Wagner Luiz Tafuri/Coordenador Wagner Luiz Tafuri

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

Prof. Wagner Luiz Tafuri,
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Patologia
Faculdade de Medicina/UFMG

[assinatura]
CONFERE COM O ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado à memória de Ana Margarida Miguel Ferreira Nogueira e Maria Ophelia Galvão de Araújo. Amigas, mestras, que construíram e deram forma à minha vida profissional. E ainda o fazem.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Criador de todas as coisas simples, que ainda nos parecem complicadas, agradeço a oportunidade de conhecer a sua maior criação, a experiência da Vida.

A minha família, instrumento da Criação e fonte de aprendizado no amor.

Ao Professor Dr. Geovanni Dantas Cassali, a gratidão pela orientação deste trabalho, mais ainda, por ter sido o instrumento da minha recondução ao prazer de trabalhar e estudar.

A Professora Dra. Angélica Cavalheiro Bertagnolli, co-orientadora deste trabalho, pela ajuda na realização da parte técnica, seleção de casos, referências bibliográficas, correção de texto. Pela amizade e exemplo de disciplina e perseverança.

A Professora Dra. Gleidice Eunice Lavalle, pelo cuidado e dedicação na leitura do trabalho final.

A Professora Dra. Helenice Gobbi, agradeço pelas críticas ao projeto deste trabalho, nas duas oportunidades em que foi convidada, dando direção e sentido às idéias e preenchendo lacunas. Agradeço também pelo papel de educadora em toda minha vida, graduação, residência, pós graduação. Esteve presente como mestra e amiga, em passos que foram fundamentais para estar no lugar em que me encontro.

Ao Dr. Rafael Malagoli Rocha, pela realização de parte das reações de imunohistoquímica necessárias à conclusão deste trabalho e pela atenção dispensada durante a execução do trabalho.

Aos amigos e colegas Ênio Ferreira e Cristina Maria de Souza, pela ajuda na realização da parte técnica e teórica deste trabalho e pelos momentos de grande alegria durante a convivência no laboratório. Pela capacidade de agregar interesse e trabalho com humor e leveza.

A todos os amigos e colegas do laboratório, Liliane, Wanessa, Renata, Patrícia, Mariana, Alessandra, Karine e Gleidice, pelo estímulo diário da convivência.

A Professora Dra. Mônica Maria Demas Álvares Cabral, querida amiga e companheira de trabalho, pela ajuda na realização de cortes histológicos de casos desta tese.

Ao colega Conrado Gamba e ao acadêmico Everton Jr. pela ajuda na seleção de casos deste trabalho.

Ao Professor Wanderson Geraldo de Lima, pela ajuda na orientação da documentação fotográfica deste trabalho.

A técnica Luciene, do Instituto Alfa de Gastroenterologia, pela disponibilidade em ajudar na parte técnica deste trabalho.

Aos amigos e colegas Professores Dr. José Carlos Nogueira e Dr. Jonas Carlos Campos Pereira, pelo incentivo e acompanhamento constantes durante o desenvolvimento e execução deste trabalho.

As grandes amigas Sandra Regina Quintino dos Santos e Joana Quintino dos Santos Damásio, pela tradução do texto em inglês, pela amizade e companheirismo.

A meus queridos e inseparáveis amigos, Abel, Adriana, Aline, Fátima, Lílian e Regina Helena, pelo suporte e por me suportarem durante todos os momentos da construção deste trabalho.

"Um ser humano amar a outro talvez seja a mais difícil das tarefas,
a mais importante, o último teste e prova, o trabalho para o qual
todos os trabalhos só foram preparação."

Rainer Maria Rilke

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Patologia Comparada do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG com apoio financeiro do CNPq, FAPEMIG e CAPES.

SUMÁRIO

Lista de anexos	13
Lista de figuras	13
Lista de gráficos	13
Lista de tabelas	14
Lista de abreviaturas	16
Resumo	17
Abstract	18
1. Introdução	19
2. Objetivos	20
2.1. Objetivos gerais	20
2.2. Objetivos específicos	20
3. Revisão da literatura - neoplasias mamárias da cadela	22
3.1. Fatores de risco e prognósticos em tumores malignos mamários da cadela	23
3.1.1. Estadiamento	23
3.1.2. Tamanho tumoral	25
3.1.3. Acometimento de linfonodos regionais/ metástases à distância	26
3.1.4. Tipo histológico e grau de diferenciação	27
3.1.5. Tipo de crescimento tumoral	29
3.1.6. Idade	29
3.1.7. Ação estrogênica e obesidade	30
3.1.8. Raça	31
3.1.9. Índice de proliferação celular	31
3.1.10. Angiogênese	32

3.1.11. Expressão de ciclooxygenase (cox)- 2	32
3.1.12. Região organizadora do nucléolo	33
3.1.13. Receptores hormonais	33
3.1.14. Hormônios esteróides e fator de crescimento epidérmico (EGF)	35
3.1.15. Amplificação do oncogene <i>HER-2</i> , superexpressão da proteína HER-2	37
3.1.16. Moléculas de adesão	39
3.1.17. Mutação e superexpressão do gene p53	39
3.1.18. Identificação de fenótipos moleculares de carcinomas mamários caninos	40
3.1.19. Carcinomas com perfil “basal-like”	45
3.2. Tumores mistos da mama da cadela	46
3.3. O carcinoma metaplásico da mama humana	48
4. Material e métodos	55
4.1. Seleção de casos	55
4.2. Processamento e avaliação histológica	55
4.3. Reação de imunohistoquímica	57
4.4. Interpretação da imunorreatividade dos carcinomas	58
4.5. Definição do perfil imunofenotípico dos carcinomas em tumores mistos da cadela	58
4.6. Análise estatística	59
5. Resultados	60
5.1. Avaliação histológica	60
5.1.1. Componente epitelial maligno <i>in situ</i>	60
5.1.2. Componente epitelial maligno invasor	60
5.1.3. Componente mesenquimal	62

5.2. Interpretação da imunorreatividade dos carcinomas	66
5.2.1. Imunorreatividade do componente epitelial maligno <i>in situ</i>	66
5.2.2. Imunorreatividade do componente epitelial invasor	67
5.2.3. Correlação entre o perfil imunofenotípico do carcinoma invasor em tumor misto da cadela e seus componentes mesenquimais	70
5.2.4. Concordância entre os perfis imunofenotípicos dos componentes epiteliais malignos <i>in situ</i> e invasor do carcinoma em tumor misto da cadela	70
6. DISCUSSÃO	71
7. CONCLUSÕES	74
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
9. ANEXOS	85

LISTA DE ANEXOS

Anexo A - Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal - CETEA UFMG	86
Anexo B - Artigo científico produzido a partir desta dissertação	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Foco de metaplasia escamosa em carcinoma em tumor misto da cadela	62
Figura 2 - Matriz mixóide em carcinoma em tumor misto da cadela	63
Figura 3 - Matriz condróide em carcinoma em tumor misto da cadela	64
Figura 4- Tipos de tecidos encontrados no componente mesenquimal do carcinoma em tumor misto	66
Figura 5: Expressão imunohistoquímica das diferentes proteínas estudadas no carcinoma em tumor misto da cadela	69

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Influência do tamanho tumoral no intervalo livre de doença em cadelas com tumores mamários malignos	25
Gráfico 2 - Influência de metástases em linfonodos regionais no intervalo livre de doença em cadelas com câncer de mama	27
Gráfico 3 - Relação entre o grau histológico e a sobrevida após dois anos de cirurgia em 85 cadelas com carcinoma mamário	29
Gráfico 4 - Relação entre a superexpressão da proteína HER-2 e sobrevida em cadelas com câncer de mama	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estadiamento de acordo com a Organização Mundial de Saúde	24
Tabela 2 - Estadiamento (modificado da OMS) em tumores mamários de cães	24
Tabela 3 - Expressão de RE- α e de RP em 155 tumores mamários caninos malignos, de acordo com o tipo histológico	34
Tabela 4 - Frequência de subtipos de carcinomas mamários caninos definidos pela imunohistoquímica	41
Tabela 5 - Associação entre subtipos moleculares de carcinomas mamários caninos, tipo histológico e grau histológico	41
Tabela 6 - Associação entre a positividade para marcadores basais e os diferentes subtipos de carcinomas mamários caninos	42
Tabela 7 - Critérios para a definição de subtipos de carcinomas mamários caninos, baseada em seu perfil imunohistoquímico	43
Tabela 8 - Associação entre subtipos moleculares de carcinomas mamários caninos, tipo histológico e grau histológico	44
Tabela 9 - Características moleculares e fatores prognósticos dos carcinomas em tumores mistos apresentados na literatura	47
Tabela 10 - Carcinoma metaplásico produtor de matriz – características clínico-morfológicas	49
Tabela 11 - Carcinoma metaplásico de células fusiformes – características clínico-morfológicas	50

Tabela 12 - Carcinoma metaplásico - carcinossarcoma –	
características clínico-morfológicas	51
Tabela 13 - Carcinoma metaplásico de células escamosas –	
características clínico-morfológicas	52
Tabela 14 - Carcinoma metaplásico de células gigantes	
osteoclastícas – características clínico-morfológicas	53
Tabela 15 - Correlação entre o número de mitoses e índice mitótico.	56
Tabela 16 - Anticorpos do painel imunohistoquímico para carcinomas	
em tumores mistos da glândula mamária da cadela	58
Tabela 17: Tipo histológico do componente epitelial <i>in situ</i>	
do carcinoma em tumor misto da mama da cadela	60
Tabela 18: Grau histológico do componente epitelial invasor	
do carcinoma em tumor misto da mama da cadela	61
Tabela 19: Índice mitótico do componente epitelial invasor do	
carcinoma em tumor misto da mama da cadela	61
Tabela 20: Tipo de tecidos encontrados no componente	
mesenquimal do carcinoma em tumor misto da cadela	65
Tabela 21: Distribuição segundo o perfil imunofenotípico do	
componente <i>in situ</i> do carcinoma em tumor misto da cadela	67
Tabela 22: Distribuição segundo o perfil imunofenotípico do	
componente invasor do carcinoma em tumor misto da cadela	68
Tabela 23: Concordância entre o perfil imunofetotípico do	
componente <i>in situ</i> e invasor no carcinoma em tumor misto da	
cadela	70

LISTA DE ABREVIATURAS

COX-1: Ciclooxygenase-1

COX-2: Ciclooxygenase-2

CK5: Citoqueratina 5

CK 5/6: Citoqueratinas 5 e 6

DAB: Diaminobenzidina

EGF: Fator de crescimento epidérmico

EGFR: Receptor para fator de crescimento epidérmico

H&E: Hematoxilina e eosina

HER2: Receptor para fator de crescimento epidérmico 2

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

IHQ: Imunohistoquímica

Ki-67: Proteína marcadora de proliferação celular.

LPC: Laboratório de Patologia Comparada

NORs: Regiões organizadoras do nucléolo

OMS: Organização Mundial da Saúde

p53: Gene que codifica a proteína homônima.

p63: Gene análogo ao p53, que codifica a proteína homônima.

PCNA: antígeno nuclear de células em proliferação

RE: Receptor para estrógeno

RE- α :Receptor para estrógeno tipo alfa

RP: Receptor para progesterona

TGF- α : Fator de crescimento transformante alfa

TGF- β_1 : Fator de crescimento transformante beta-1

UFMG Universidade Federal de Minas Gerais

S100 Proteína S100

RESUMO

Os tumores mamários em cães são neoplasias freqüentes e cerca de 50% correspondem a carcinomas. O carcinoma em tumor misto da cadela é uma neoplasia frequente e corresponde a uma lesão com elementos epiteliais malignos (*in situ* e invasor) entre elementos mesenquimais benignos. Os objetivos deste estudo são descrever as características morfológicas encontradas no carcinoma em tumor misto da mama da cadela e classificá-los conforme a classificação humana, identificar o perfil imunofenotípico de carcinomas em tumores mistos da mama da cadela empregando-se um painel de marcadores imunohistoquímicos e correlacionar os achados morfológicos do carcinoma em tumor misto da mama da cadela com seu perfil imunofenotípico. Foi realizado um estudo descritivo de 29 casos de carcinoma em tumor misto da cadela, onde se estudaram as suas características morfológicas, avaliando o grau histológico e tipo histológico dos componentes *in situ* e invasor. No componente mesenquimal foram avaliadas as frequências da presença de matriz mixóide e condro-mixóide, bem como de componentes mesenquimais (cartilagem, tecido ósseo e medula óssea). Foi realizado um painel de imunohistoquímica semelhante ao realizado para estudo de carcinomas na espécie humana: receptores hormonais, receptor para o fator de crescimento epidérmico humano do tipo 2 (HER2), citoqueratina 5 (CK5) e receptor para o fator de crescimento epidérmico tipo I (EGFR). Foi observado que o carcinoma em tumor misto da cadela apresenta características morfológicas semelhantes ao carcinoma metaplásico da mama humana em 100% dos casos. Todos os tumores apresentavam matriz mixóide ou condromixóide em seu componente mesenquimal, além de elementos como cartilagem (13,8%), cartilagem e tecido ósseo (10,3%), ou cartilagem, tecido ósseo e medula óssea (10,3%). O componente epitelial apresentava grau histológico I em 55,2% dos casos, grau histológico II em 34,5% dos casos e grau histológico III em 10,5% dos casos. O tipo histológico mais frequente do componente epitelial maligno *in situ* foi sólido. O imunofenótipo mais frequente do componente epitelial maligno invasor foi o subtipo Luminal A (41,4%), seguido do subtipo “basal-like” (27,6%), não sendo observada correlação estatisticamente significativa com o grau histológico ($p=0,735$). Houve correlação estatisticamente significativa entre o perfil imunofenotípico dos componentes epiteliais malignos, invasor e *in situ* (Coeficiente de Kappa=0,816, $p<0,001$). Conclui-se que o carcinoma em tumor misto da mama da cadela apresenta componentes semelhantes ao carcinoma metaplásico da mama humana, mas apresenta características discordantes quanto ao grau histológico e perfil imunofenotípico.

Palavras-chave: glândula mamária, neoplásicas, cão, carcinoma em tumor misto

ABSTRACT

Mammary tumors in dogs are frequent neoplasms and carcinomas represent for 50% of all. The carcinoma in mixed tumor in dogs is frequent and is composed by malignant epithelial elements (*in situ* and invasive) and benign mesenchymal elements. The aim of this study is to describe morphological findings in canine carcinoma in mixed tumor and classify them like human patterns, also identify the immunophenotypical profile of those carcinomas using immunohistochemical markers and correlate the morphological and immunophenotypical characteristics. Descriptive analysis of 29 cases of carcinoma of mixed tumor was done to investigate morphological features, estimating histological grade and histological type of *in situ* and invasive elements in carcinomatous component. For mesenchymal component we estimated the frequency of mixoid and chondro-mixoid matrix and mesenchymal elements (cartilage, bone and bone marrow) as well. The immunohistochemical study included: hormone receptors (ER and PR), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), cytokeratin 5 (CK5) and epidermal growth factor type I receptor (EGFR). Carcinoma in mixed tumor in female dogs showed morphological features very similar to the metaplastic carcinoma of human breast. All tumors showed mixoid or chondro-mixoid matrix in mesenchymal component besides elements like cartilage (13.8%), cartilage/bone (10.3%) and cartilage/bone/bone marrow (10.3%). The epithelial component showed histological grade I in 55.2% of cases, histological grade II in 34.5% of cases and histological grade III in 1.5% of cases. The most frequent histotype of malignant epithelial component *in situ* was Solid. Immunophenotypically, invasive malignant epithelial component showed more frequency of luminal A (41.4%) followed by basal-like (27.6%) subtypes, no statistical significance was observed with histological grade ($p=0.735$). There was statistical significance on the immunophenotypical profile of malignant epithelial component in (*situ* and invasive) (Kappa coefficient=0.816; $p<0.01$). We concluded that carcinoma in mixed tumor in dogs show tissue components very similar to metaplastic carcinoma of human breast, but discordant features in relation of histological grade and immunophenotypical profile. These data suggest that additional studies are needed on clinical and pathological characteristics of canine mammary tumors in order to use it like model for compared pathology.

Key-words: mammary gland, tumor, canine, carcinoma in mixed tumor.

1. INTRODUÇÃO

Os tumores mamários correspondem a uma das mais frequentes neoplasias em cães (DOBSON et al., 2002) e a uma das causas mais frequentes de morte por neoplasia nestes animais, sendo frequentemente comparados às neoplasias mamárias em humanos (MULLIGAN 1975; MISDORP & HART, 1976; HELLMÉN et al., 1993; GERALDES et al., 2000; CASSALI, 2000; RICHARDS et al., 2001; LEE et al., 2004; MERLO et al., 2008).

O carcinoma em tumor misto da cadela é um dos exemplos mais frequentes destas neoplasias, correspondendo a cerca de 42% das neoplasias malignas diagnosticadas na mama de cadelas (CASSALI et al, 2009).

Estes tumores são raros em mulheres e apresentam características histológicas comparáveis ao carcinoma metaplásico da mama humana (GENELHU et al., 2007).

O carcinoma metaplásico corresponde a um grupo heterogêneo de tumores, correspondendo a menos de 1% de todos os carcinomas invasores da mama humana (REIS-FILHO et al., 2005) e frequentemente apresenta um prognóstico desfavorável, sendo que metástases à distância são comuns, mesmo quando os linfonodos regionais não estão acometidos (LUINI et al., 2007).

REIS-FILHO et al. (2006) observaram que os carcinomas metaplásicos apresentavam um perfil imunohistoquímico semelhante ao carcinoma do subtipo “basal-like”. Neste estudo, os autores identificaram um fenótipo típico deste subtipo em 91% dos casos, ou seja, negatividade para RE e HER-2 e positividade para EGFR e/ou CK5/6.

Na literatura encontram-se poucos dados sobre as características imunofenotípicas do carcinoma em tumor misto da cadela, em geral envolvendo elementos isolados das lesões (RUNGSIPIPAT et al., 1999; KARAYANNOPOULOU et al., 2005; MARTÍN DE LAS MULAS et al., 2005; DUTRA et al., 2008; BERTAGNOLLI et al. 2009; GAMA et al., 2009) ou realizando-se estudo com painel de imunohistoquímica (SASSI et al., 2010).

Afinal, seria mesmo o carcinoma em tumor misto um exemplo de Carcinoma metaplásico? Este tumor apresentaria um perfil imunofenotípico bem caracterizado e seria adequada sua utilização como modelo experimental para seu correspondente na mama humana?

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

- Descrever as características morfológicas encontradas no carcinoma em tumor misto da mama da cadela e classificá-los conforme a classificação humana.
- Identificar o perfil imunofenotípico de carcinomas em tumores mistos da mama da cadela empregando-se um painel de marcadores imunohistoquímicos.
- Correlacionar os achados morfológicos do carcinoma em tumor misto da mama da cadela com seu perfil imunofenotípico.

2.2. Objetivos específicos:

- Descrever os seguintes parâmetros morfológicos no carcinoma em tumor misto da cadela: tipo histológico, grau histológico, índice mitótico, presença de necrose tumoral, invasão vascular.
- Descrever componentes mesenquimais do tumor quanto à presença de matriz mixóide e condróide, presença de elementos mesenquimais (cartilagem, tecido ósseo e medula óssea), bem como a presença de atipias ou características de malignidade;
- Classificar o carcinoma em tumor misto da cadela de acordo com os critérios morfológicos utilizados para classificar os carcinomas metaplásicos da mama humana.
- Caracterizar o perfil molecular do componente epitelial maligno (*in situ* e invasor) das lesões estudadas, utilizando-se um painel imunohistoquímico com o objetivo de identificar os subtipos imunofenotípicos conforme descrito para os carcinomas da mama humana: luminal A, luminal B, HER2, carcinoma do tipo “basal-like” e carcinoma do tipo mama normal.

- Avaliar a frequência dos perfis imunofenotípicos (Luminal A, Luminal B, HER2, “basal-like” e mama normal) do componente epitelial maligno *in situ* (quando presente) e invasor do carcinoma em tumor misto da cadela.
- Correlacionar o perfil imunofenotípico (Luminal A, Luminal B, HER2, “basal-like” e mama normal) encontrado no componente epitelial maligno invasor do carcinoma em tumor misto da cadela com o grau de diferenciação do tumor, bem como com o índice mitótico.
- Correlacionar a concordância entre o perfil imunofenotípico (Luminal A, Luminal B, HER2, “basal-like” e mama normal) encontrado no componente *in situ* (quando houver) e o perfil imunofenotípico (Luminal A, Luminal B, HER2, “basal-like” e mama normal) encontrado no componente invasor do carcinoma em tumor misto da cadela.
- Verificar as frequências dos graus histológicos e índice mitótico encontrados no componente invasor do carcinoma em tumor misto da cadela.
- Nos casos de carcinoma invasor sem componente *in situ*, verificar a frequência dos perfis imunofenotípicos dos mesmos.

3. REVISÃO DA LITERATURA – NEOPLASIAS MAMÁRIAS DA CADELA

A mama corresponde ao órgão mais comumente acometido por neoplasias em cães, sendo o terceiro sítio mais freqüente em incidência nesta espécie, no Reino Unido, (DOBSON et al., 2002). Na cidade de Gênova, na Itália, a incidência de câncer de mama é estimada em 99,3/ 100.000 cães/ ano (MERLO et al., 2008). Existem poucos trabalhos sobre o assunto na literatura, sendo desconhecidos dados disponíveis no Brasil.

Quando se consideram todas as neoplasias malignas em cadelas, a mama é o local mais comum de seu aparecimento, com uma freqüência entre 25% e 53,3% (MARTINS et al., 2002; SORENMO, 2003) e em cerca da metade dos casos apresenta características de malignidade (GILBERTSON et al, 1983; NERURKAR et al. 1989).

Além de ser uma das mais frequentes causas de morte entre estes animais, estas neoplasias apresentam características similares às observadas nas neoplasias mamárias humanas (MULLIGAN 1975; MISDORP & HART, 1976; HELLMÉN et al., 1993; GERALDES et al., 2000; CASSALI, 2000; RICHARDS et al., 2001; LEE et al., 2004; MERLO et al., 2008), sendo de grande interesse o conhecimento de sua etiopatogenia e de suas características biológicas em estudos de patologia comparada.

Aproximadamente 50% dos tumores mamários que acometem a cadela são tumores mistos (MOULTON et al., 1970). Estes tumores são raros em mulheres e apresentam características histológicas comparáveis ao carcinoma metaplásico da mama humana (GENELHU et al., 2007). Entretanto, são freqüentes na glândula salivar, onde são denominados adenomas pleomórficos (EVESON et al., 2005).

Um recente levantamento da casuística de tumores mamários da cadela diagnosticados no período de 2000/2008 no Laboratório de Patologia Comparada (LPC) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) mostrou dados semelhantes aos citados na literatura. No levantamento foram analisados 1072 casos e destes, 39,5% foram tumores

benignos e 60,5% foram malignos. Das neoplasias malignas diagnosticadas, 42% corresponderam a carcinoma em tumor misto (CASSALI et al, 2009).

3.1. Fatores de risco e prognósticos em tumores malignos mamários da cadela

O estudo dos fatores de risco é importante para o entendimento da patogênese das neoplasias e os fatores prognósticos são úteis para definição da evolução da doença e seu tratamento. No caso dos tumores mamários em cadelas, ainda são úteis para estudos em patologia comparada, na busca de modelos experimentais para pesquisa. A seguir, citam-se fatores de risco e prognósticos mais importantes para o estudo do câncer mamário em cães:

3.1.1. Estadiamento

O estadiamento, que é um parâmetro crucial para a definição da abordagem clínica dos tumores malignos envolve os seguintes parâmetros: tamanho do tumor, acometimento de linfonodos regionais e presença de metástases à distância (OWEN, 1980; PHILIBERT et al., 2003).

Segundo GILBERTSON et al., (1983) há uma relação direta entre a extensão do tumor no momento do tratamento cirúrgico e o risco de recorrência ou do surgimento de um segundo tumor primário. Num estudo envolvendo 232 cadelas submetidas à mastectomia por tumores mamários, estes autores concluíram que as cadelas que situadas no estágio II apresentaram uma taxa de recorrência do tumor em 95% e um risco relativo de recorrência seis vezes maior, em relação ao grupo de cadelas situadas no estágio I.

PHILIBERT et al. (2003), num estudo multivariado sobre a influência de fatores de sobrevida em cadelas com tumores malignos mamários, observaram que cadelas classificadas no estágio II ou maior apresentavam significativa queda na sobrevida.

Duas propostas de estadiamento para os tumores mamários em cadelas são apresentadas nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Estadiamento de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) em tumores mamários de cães

Estadio	Tumor primário (T)	“Status” de linfonodos regionais (N)	Metástases à distância (M)
I	T1 a, b ou c	N0 ou N1a ou N2a	M0
II	T0	N1	M0
	T1a, b ou c	N1	
	T2a, b ou c	N0 ou N1	
III	T3 a, b ou c	Qualquer N	M0
	Qualquer T	Qualquer N b	
IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

T1, < 3 cm de diâmetro máximo; T2, 3 – 5 cm de diâmetro máximo; T3, 5 cm de diâmetro máximo; a, não aderido, b, aderido à pele; c, aderido ao músculo. N0, sem metástases na histopatologia; N1, linfonodos regionais ipsilaterais envolvidos; N2, linfonodos regionais bilaterais envolvidos; a, não aderidos; b, aderidos, M0, sem metástases à distância, M1, metástases à distância detectadas. (OWEN, 1980).

Tabela 2: Estadiamento (modificado da OMS) em tumores mamários de cães

Estadio	Tumor primário (T)	“Status” de linfonodos regionais (N)	Metástases à distância (M)
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0	M0
IV	Qualquer T	N1	M0
V	Qualquer T	Qualquer N	M1

T1, < 3 cm de diâmetro máximo; T2, 3 – 5 cm de diâmetro máximo; T3, . 5 cm de diâmetro máximo; N0, sem metástases na histopatologia; M0, sem metástases à distância, M1, metástases à distância detectadas. (PHILIBERT et al., 2003).

3.1.2. Tamanho tumoral

O tamanho tumoral é considerado um fator prognóstico independente no câncer de mama de cadelas. Tumores menores que 3,0 cm correlacionam-se significativamente com melhor prognóstico que tumores maiores que 3,0 cm. Este parâmetro tem a vantagem de ser facilmente obtido e deve ser considerada na decisão de terapia complementar (SORENMO, 2003). O gráfico 1 mostra a influência do tamanho tumoral (volume) no intervalo livre de doenças em cadelas com tumores mamários malignos.

Gráfico 1: Influência do tamanho tumoral no intervalo livre de doença em cadelas com tumores mamários malignos.

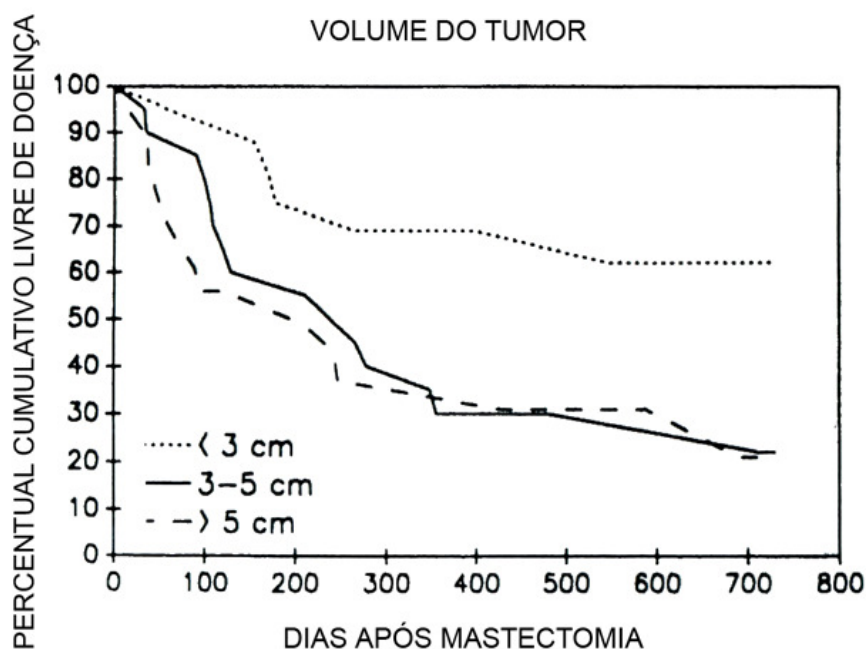


Gráfico 1: Curva de Kaplan-Meier mostrando o intervalo livre de doença, de acordo com o tamanho tumoral em cadelas com tumores mamários malignos localmente invasores (modificado de: KURZMAN & GILBERTSON, 1986).

FERREIRA et al. (2009), num estudo com tumores mamários caninos envolvendo 15 tumores benignos e 23 malignos, observaram que a maioria das lesões acima de 5 cm (T3) era maligna, apresentava índice de proliferação mais

elevado e menor positividade para receptores de progesterona (RP), quando comparados com tumores menores (T1, T2).

É importante considerar que em alguns estudos, os parâmetros de tamanho tumoral diferem dos preconizados pela OMS e que os resultados, neste caso, podem ser diversos no que se refere à relevância deste parâmetro na definição do prognóstico da doença. MISDORP & HART (1976), por exemplo, em um estudo sobre fatores prognósticos em câncer de mama em cadelas, utilizaram como pontos de corte os seguintes diâmetros da lesão: menor que 5 cm, entre 6 e 10 cm, entre 11 e 15 cm e maior que 15 cm. Neste estudo, esta variável não revelou ser estatisticamente significativa, quando avaliados apenas entre os casos de carcinomas, mas mostrou-se significativa quando comparada entre os grupos de sarcomas e carcinomas.

3.1.3. Acometimento de linfonodos regionais/ metástases à distância

Quando há metástases em linfonodos regionais, há uma significativa queda na expectativa de sobrevida em relação aos indivíduos com pesquisa negativa para metástases em linfonodos (SORENMO, 2003).

HELLMÉN et al. (1993) encontraram, num estudo com análise uni e multivariada envolvendo 202 cadelas com câncer de mama, que o acometimento de linfonodos regionais foi um fator prognóstico desfavorável estatisticamente significativo na análise univariada, porém não foi significativo na análise multivariada. Os autores justificam que estes resultados devem ter sofrido influência de um grupo de cadelas do estudo que apresentava sarcomas mamários, pois este tipo de neoplasia apresenta preferencialmente disseminação pela via hematogênica.

A presença de metástases à distância torna pior o prognóstico, em relação às cadelas que apresentam disseminação apenas linfonodos regionais acometidos (SORENMO, 2003).

O gráfico 2 ilustra a influência de metástases em linfonodos regionais no intervalo livre de doença em cadelas com câncer de mama.

Gráfico 2: Influência de metástases em linfonodos regionais no intervalo livre de doença em cadelas com câncer de mama.

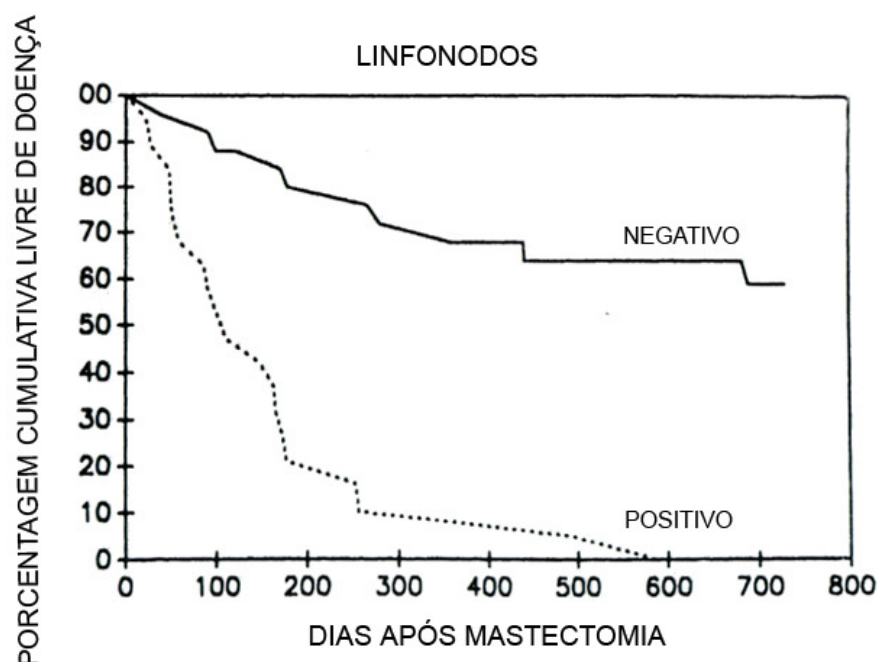


Gráfico 2: Presença de metástases em linfonodos regionais como um fator prognóstico em tumores mamários malignos em cadelas. Curva de Kaplan-Meier mostrando o intervalo livre de doença, de acordo com a presença de metástases em linfonodos de cadelas com tumores mamários malignos localmente invasores (modificado de: KURZMAN & GILBERTSON, 1986).

Além do estadiamento, outros fatores clínicos e patológicos podem ser úteis para a condução dos casos de câncer de mama em cadelas. A seguir, descrevem-se sumariamente os mais comentados na literatura sobre o assunto:

3.1.4. Tipo histológico e grau de diferenciação

As classificações dos tumores mamários em cães são elaboradas considerando-se seu tecido de origem (epitelial, mioepitelial, mesenquimal), de suas características morfológicas e seu prognóstico. A classificação mais aceita (MISDORP et al., 1999) combina características histogênicas e características morfológicas, além de considerar as características histológicas importantes para o prognóstico da lesão.

Os carcinomas *in situ* e os adenocarcinomas apresentam prognóstico mais favorável, enquanto os carcinomas anaplásicos e carcinomas inflamatórios

apresentam pior prognóstico. (SORENMO, 2003). À exceção dos carcinomas inflamatórios, os sarcomas mamários das cadelas tendem a apresentar evolução mais desfavorável que os carcinomas. (HELLMÉN et al., 1993; SORENMO, 2003).

De acordo com MISDORP & HART (1976), o tipo histológico do tumor é uma variável independente como fator prognóstico na sobrevida.

Em um estudo retrospectivo envolvendo 99 cadelas, PHILIBERT et al. (2003) constataram que o tipo histológico do tumor foi um fator prognóstico significativo, em relação à sobrevida, quando realizada análise univariada, entretanto, a mesma variável não se mostrou significativa, quando realizada uma análise multivariada.

A gradação de uma neoplasia maligna baseia-se em características morfológicas do tumor, como pleomorfismo nuclear, arquitetura e índice mitótico, entre outros.

Em relação à gradação histológica dos carcinomas mamários em cadelas, o maior problema em definir a sua importância como fator prognóstico é a variedade de sistemas de gradação. Entre os mais utilizados, citam-se os de GILBERTSON et al. (1983) e MISDORP et al. (1999), ambos baseados na combinação entre características celulares e nucleares. KARAYANNOPOULOU et al. (2005) propuseram a utilização do método utilizado em humanos, proposto por ELSTON & ELLIS (1991). No estudo utilizando 85 carcinomas mamários de cadelas, os autores encontraram uma relação estatisticamente significativa do grau histológico com a sobrevida dos indivíduos. De acordo com os resultados, as cadelas que apresentavam tumores classificados como grau III apresentavam um risco de morte 21 vezes maior em relação às cadelas com tumores classificados como grau I ou II. Os carcinomas grau III apresentam aumento do risco de morte de sete vezes, em relação aos carcinomas grau II.

O gráfico 3 ilustra os resultados obtidos neste estudo.

Gráfico 3: Relação entre o grau histológico e a sobrevida após dois anos de cirurgia em 85 cadelas com carcinoma mamário.

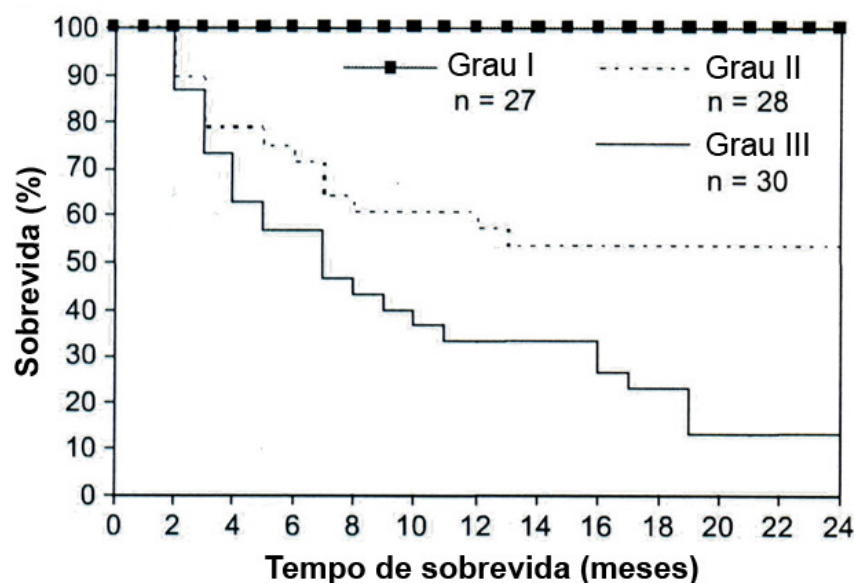


Gráfico 3: Significância: grau I vs. grau II, $P < 0,001$; grau I vs. grau III, $P < 0,001$; grau II vs. grau III, $P < 0,05$ (modificado de KARAYANNOPOULOU et al., 2005).

3.1.5. Tipo de crescimento tumoral

De acordo com MISDORP & HART (1976), o crescimento tumoral expansivo tem um prognóstico melhor que o crescimento infiltrativo. Estes autores consideraram este parâmetro como um dos mais importantes fatores prognósticos.

3.1.6. Idade

Idade avançada no diagnóstico de câncer mamário em cadelas é um fator prognóstico desfavorável. Entretanto, a idade avançada não se relaciona a um fenótipo mais agressivo e pode não ser um fator desfavorável, se analisado isoladamente. (SORENMO, 2003).

HELLMÉN et al., (1993), em um estudo prospectivo envolvendo 202 cadelas, constatou que a idade dos animais, na época da cirurgia para tratamento do tumor, foi um fator prognóstico estatisticamente significativo para a morte

causada pela evolução da doença, tanto em uma análise univariada quanto em uma análise multivariada. Considerou que a idade seria a melhor variável clínica para avaliação do prognóstico nestes indivíduos.

PÉREZ ALENZA et al. (1998) concluíram, em um estudo de caso-controle com análise multivariada, que a idade é um fator de risco independente para o desenvolvimento de câncer de mama em cadelas.

PHILIBERT et al (2003), entretanto, não encontraram diferenças significativas em relação a idade e evolução de neoplasias mamárias malignas em cadelas. Os autores consideram ainda que cadelas com a mesma idade, porém de raças e tamanhos diferentes apresentam fisiologia diversa, o que dificulta a interpretação dos resultados.

3.1.7. Ação estrogênica e obesidade

Estrógeno e progesterona têm um papel fundamental no desenvolvimento da glândula mamária normal e estes hormônios estão implicados no desenvolvimento de tumores mamários em cães. Estrógenos são promotores de células iniciadas, além de regular a transcrição de vários proto-oncogenes. Alguns carcinomas da mama da cadela apresentam receptores para estes hormônios e a ovariectomia profilática é um método preconizado para a prevenção destas neoplasias (SORENMO, 2003).

Mesmo em cadelas ovariectomizadas, a obesidade no primeiro ano de vida aumenta o risco do desenvolvimento de neoplasias mamárias. Em um estudo caso controle envolvendo 198 cadelas, PÉREZ ALENZA (1998) concluiu que obesidade é um fator de risco independente para o desenvolvimento de câncer de mama nestes animais.

PHILIBERT et al. (2003), num estudo retrospectivo sobre fatores prognósticos e sobrevida em cadelas com tumores mamários malignos, envolvendo 99 cadelas, não encontraram correlação estatisticamente significativa entre obesidade e a predisposição ao desenvolvimento de neoplasias mamárias, nem alteração na sobrevida dos animais acometidos pela doença. Os autores consideram que a obesidade poderia predispor a uma maior concentração de

estrógeno circulante, entre outros hormônios, favorecendo a proliferação de células epiteliais com receptores para estes hormônios.

3.1.8. Raça

O fator raça é considerado como importante para o risco de desenvolvimento de tumores mamários em cadelas. De acordo com SORENMO (2003), as raças de pequeno porte têm uma maior tendência de desenvolverem tumores mamários. Este autor cita algumas raças que apresentam esta tendência, como Poodles (Toy e miniatura), Cocker Spaniel, Setter Inglês, Pointer, Maltês, Yorkshire, Daschund, entre outros.

ITOH et al. (2005), entretanto, encontraram dados contrários, onde cadelas de raças de pequeno porte apresentam uma menor incidência de tumores mamários malignos, em relação às cadelas de raças de grande porte. O primeiro grupo também apresenta, nos casos de tumores malignos mamários, grau histológico e estadiamento mais baixos, além de uma sobrevida maior, quando comparado com o grupo de cadelas de raças de grande porte.

3.1.9. Índice de proliferação celular

De acordo com PEÑA et al. (1998), o índice de proliferação celular é um fator prognóstico de grande valor em carcinomas mamários caninos. Neste estudo, utilizando marcadores de proliferação celular (Ki-67 e antígeno nuclear de células em proliferação - PCNA), os autores observaram que houve correlação desta variável com o grau histológico do tumor, grau nuclear, metástases, morte pela neoplasia e menor tempo livre de doença, após a cirurgia pelo tumor. Neste estudo, os autores verificaram que o índice de proliferação celular, estimado pela análise da expressão da proteína Ki-67, foi um fator prognóstico independente para metástases, sobrevida global e tempo livre de doença.

DUTRA et al. (2008) observaram relação inversa entre o índice mitótico e o índice de proliferação MIB-1 com a sobrevida, em uma análise univariada.

3.1.10. Angiogênese

A neovascularização é um fator crucial para o crescimento tumoral e a ocorrência de metástases. A evidência de neovascularização ao exame histopatológico através da medida da densidade microvascular tem sido considerada como um fator preditivo desfavorável em tumores malignos da mama da cadela, aumentando o risco de recorrência, metástases em linfonodos e menor grau de diferenciação (SORENMO, 2003).

3.1.11. Expressão de ciclooxigenase (COX)- 2

O sistema enzimático da ciclooxigenase é composto por dois elementos, a ciclooxigenase-1 (COX)-1 e ciclooxigenase-2 (COX)-2. Ambas compõem parte do complexo prostaglandina sintetase e participam da formação das prostaglandinas, a partir do ácido aracdônico. São substancialmente diferentes quanto aos seus padrões de expressão e biologia (MILLANTA et al., 2006). (COX)-1 é uma enzima constitutiva, ou seja, cuja síntese não depende da presença de substrato específico, expressa por quase todos os tipos de tecidos em funções fisiológicas. (COX)-2 é sintetizada a partir de fatores de crescimento, promotores de tumores, hormônios, endotoxinas bacterianas e estresse (APPLEBY et al., 1994).

Na medicina humana, a expressão de (COX)-2 em câncer de cólon e mama está aumentada, tanto em lesões pré-neoplásicas quanto em neoplasias mais agressivas. Neoplasias com aumento da expressão desta enzima estão associadas com pior prognóstico em mulheres com câncer de mama (COSTA et al., 2002).

De acordo com MILLANTA et al. (2006), em carcinomas mamários caninos, a superexpressão de (COX)-2 foi relacionada com negatividade para receptores de estrógeno (RE) e positividade para receptores de progesterona (RP). Foi relacionada também com angiogênese, superexpressão de HER-2 e dediferenciação tumoral. A superexpressão desta enzima também se correlacionou com pior prognóstico em cadelas.

LAVALLE et al. (2009), em um estudo de 46 carcinomas mamários de cadelas, observaram uma correlação entre a expressão de (COX)-2 e

angiogênese, bem como menor sobrevida. Os autores sugeriram que a utilização de inibidores de (COX)-2 nestes casos poderia ser uma alternativa para o tratamento e controle de carcinomas avançados em cadelas.

3.1.12. Região organizadora do nucléolo

A contagem do número de regiões organizadoras do nucléolo (NORs) se correlaciona com o prognóstico de tumores mamários caninos (BOSTOCK et al., 1992). De acordo com estes autores, os tumores mamários caninos benignos apresentaram uma contagem menor destas regiões, em relação aos tumores malignos, e tumores malignos com uma contagem alta de NORs apresentaram sobrevida mais curta em um ano após a cirurgia.

3.1.13. Receptores hormonais

Os tumores epiteliais mamários caninos podem apresentar receptores hormonais (estrógeno – RE e progesterona – RP) e cadelas que apresentam carcinomas com positividade para estes receptores apresentam maior sobrevida, além de serem candidatas a hormonioterapia (MARTIN et al., 1984).

Segundo SORENMO (2003), a maioria dos tumores mamários em cadelas (tanto os benignos quanto os malignos) apresenta RE. Segundo este autor, há uma relação inversa entre a expressão destes receptores e o grau de diferenciação histológica. Tumores epiteliais benignos e carcinomas bem diferenciados apresentam frequentemente positividade para RE, enquanto tumores pouco diferenciados ou anaplásicos tendem a ser negativos para este receptor hormonal. De acordo com este autor, as cadelas mais jovens e não castradas apresentam mais frequentemente tumores contendo receptores de estrógeno do que cadelas ovariectomizadas.

NIETO et al. (2000) relata a presença de RE- α e de RP em mais de 50% dos carcinomas mamários caninos. Estes autores, em uma análise univariada, encontraram maior positividade para RE- α em tumores mamários de cadelas não castradas, em relação aos tumores das cadelas castradas. Observaram também que a pesquisa negativa para receptores de estrógeno era mais frequente em tumores com metástases em linfonodos regionais do que nos tumores sem

metástase. Ainda no mesmo estudo, em uma análise multivariada, os autores não encontraram relação estatisticamente significativa entre a recorrência tumoral e a presença de RE- α em tumores malignos caninos.

MARTÍN DE LAS MULAS et al. (2005) encontraram uma positividade para RE- α e/ou RP em 66% entre tumores malignos de cadelas. A tabela 3 mostra a positividade para receptores hormonais em carcinomas mamários caninos, de acordo com seu tipo histológico. Neste estudo, os autores encontraram uma relação estatisticamente significativa entre a presença de receptores hormonais nos carcinomas e um maior intervalo livre de doença, na análise univariada, porém este resultado não se confirmou na análise multivariada, onde apenas o tamanho tumoral e o grau histológico permaneceram como fatores prognósticos independentes.

Tabela 3: Expressão de RE- α e de RP em 155 tumores mamários caninos malignos, de acordo com o tipo histológico

	RE- α (+) RP (+)	RE- α (+) RP (-)	RE- α (-) RP (+)	RE- α (-) RP (-)	RE- α (+) e/ou RP (+)
Tipo histológico	34 (22%)	2 (1%)	67 (43%)	52 (34%)	103 (66%)
Carcinoma simples	8	1	18	38	26%
Carcinoma complexo	13	0	28	5	40%
Carcinoma em tumor misto	13	1	21	9	34%

Modificado de: MARTÍN DE LAS MULAS et al. (2005).

GAMA et al. (2008a) encontraram um prognóstico favorável nos tumores que apresentavam positividade para receptores hormonais e estes corresponderam a 44,8% dos carcinomas mamários caninos do estudo.

3.1.14. Hormônios esteróides e fator de crescimento epidérmico (EGF)

Segundo PLAUT (1993), as interações entre hormônios (estrógeno, progesterona, corticoesteróides, entre outros) e fatores de crescimento são essenciais para a regulação do desenvolvimento da mama e lactação. O fator de crescimento epidérmico (EGF), e o fator de crescimento transformante alfa (TGF- α) são potentes indutores de mitoses durante o desenvolvimento da mama, enquanto o fator de crescimento transformante beta-1 (TGF- β_1) inibe o crescimento do tecido mamário. Tanto o EGF quanto o TGF- α ligam-se a um mesmo receptor (receptor do fator de crescimento epitelial). Estrógeno e progesterona podem regular a expressão de EGF e TGF- α , bem como de seu receptor. Apesar de apresentarem funções similares, acredita-se que o EGF e o TGF- α possam ter funções variáveis, de acordo com o local de ação e espécie animal (PLAUT, 1993).

Em cães, a mama normal e alguns tumores mamários apresentam receptores para estrógeno (RE), progesterona (RP) e para o fator de crescimento epidérmico (EGFR) (NERURKAR et al., 1987).

DONNAY et al., (1996) dosaram as concentrações de RE, RP e EGFR em 132 amostras de tecido mamário normal e 108 tumores mamários de cadelas, numa tentativa de estabelecer correlações entre estes três fatores e comparar o tecido normal com lesão neoplásica. Os autores não encontraram diferença estatisticamente significativa entre a afinidade dos receptores para as substâncias testadas entre o tecido normal e o neoplásico. Entre as lesões neoplásicas, também não observaram relação estatisticamente significativa entre a concentração de EGFR e o caráter da neoplasia (benigna/ maligna), ou entre neoplasias malignas de graus diferentes. Também não foi observada correlação entre a concentração ou positividade de EGFR nos tecidos e a idade das cadelas, tamanho do tumor ou presença de lesões múltiplas. Neste trabalho, os autores comentaram que, ao contrário dos achados em tumores mamários de mulheres, não houve correlação entre o grau histológico da neoplasia e a expressão de EGFR em tumores mamários caninos. Os autores encontraram uma correspondência entre a positividade de RE e EGFR, porém estatisticamente

significativa apenas nos tumores malignos. Estes achados também são divergentes dos encontrados em humanos.

QUEIROGA et al. (2005) avaliaram 75 amostras de mama de cadelas (tecido normal, tumores benignos e tumores malignos), realizaram a dosagem de EGF, progesterona, 17β -estradiol, androstenediona e dihidroepiandrosterona, numa tentativa de estabelecer a relação entre EGF e hormônios esteróides. Os autores encontraram positividade para EGF em tumores malignos mamários caninos e uma associação entre os níveis da substância e o grau de malignidade dos tumores. Encontraram também níveis de EGF mais elevados nos tumores malignos do que nos tumores benignos e tecido mamário normal e que nestes dois últimos grupos não houve diferença estatisticamente significativa entre os níveis de EGF. Dados semelhantes foram encontrados para os níveis dos hormônios esteróides testados. Outros parâmetros que tiveram uma associação positiva com os níveis de EGF neste estudo foram: tamanho do tumor, índice de proliferação tumoral, tipo histológico (carcinoma sólido > carcinosarcoma > carcinoma simples).

GAMA et al. (2009) estudaram 136 tumores mamários caninos (46 benignos e 90 malignos). Os autores observaram forte marcação para EGFR na membrana celular e no citoplasma da camada de células mioepiteliais de tecido mamário normal. Nos tumores benignos, observaram marcação na camada de células mioepiteliais e luminais, porém com intensidade fraca nestas últimas, em 19,6% dos casos. Nos tumores malignos, foi observada marcação forte nas células tumorais em 42,2% dos casos. Os autores observaram ainda que a expressão de EGFR se correlacionou com a idade e tamanho tumoral. Nos tumores malignos, houve uma queda significativa na sobrevida e no tempo livre de doença nos casos onde houve forte marcação para EGFR (++ ou +++).

3.1.15. Amplificação do oncogene *HER-2*, superexpressão da proteína HER-2

Alterações na estrutura e na expressão de proto-oncogenes estão envolvidas na origem e progressão de tumores. Um dos mecanismos é a amplificação e superexpressão de membros da família de genes das proteinoquinases. Estes genes controlam o crescimento celular pela fosforilação de resíduos de tirosina ou serina/ trionina de proteínas e representam vários dos oncogenes celulares e receptores de fatores do crescimento. Vários genes tirosinoquinase, incluindo o *HER-2*, estão amplificados em tumores mamários caninos (RUNGSIPIPAT et al, 1999).

Estudos mostram que tanto a amplificação do gene *HER-2* (AHERN et al., 1996), quanto superexpressão da proteína HER-2 (MARTIN DE LAS MULAS, 2003) podem estar presentes em tumores mamários caninos. O gene *HER-2* canino é mapeado no cromossoma 1q13.1 e frequentemente apresenta aberrações clonais em tumores caninos (MURUA ESCOBAR et al., 2001). Estes últimos autores encontraram superexpressão da proteína HER-2 em 17,6% de tumores mamários em cadelas e sugeriram que estes tumores poderiam ser um modelo natural para estudo de neoplasias similares em humanos.

Vários estudos mostram que, em humanos, a superexpressão da proteína HER-2 correlaciona-se com menor sobrevida, menor tempo livre de doença e pior prognóstico (PEROU et al, 2000; SORLIE et al., 2001; SORLIE et al., 2003).

RUNGSIPIPAT et al. (1999) encontraram em um estudo envolvendo 32 tumores mamários caninos benignos e 47 tumores mamários caninos malignos, imunopositividade para HER-2 em 31,6% de todos os casos. Houve positividade apenas em células neoplásicas, sendo em 50% dos casos de tumores benignos e 19,1% dos casos dos tumores malignos. O fato de observar a superexpressão deste gene em tumores benignos, segundo estes autores, sugere que as alterações devam ocorrer nos passos iniciais do desenvolvimento tumoral.

Entretanto, DUTRA et al. (2004) observaram superexpressão da proteína HER-2 em 35,4% (17/48 casos) de tumores mamários caninos malignos, e não observaram positividade em nenhum dos 22 casos de tumores mamários benignos de cadelas. Neste estudo ainda, estes autores observaram uma relação

significativa entre a positividade para a superexpressão da proteína HER-2 e o maior grau histológico e maior número de mitoses nas células tumorais.

HSU et al. (2009), num estudo envolvendo amostras de tecido mamário de 91 cadelas, encontraram superexpressão da proteína HER-2 em 29,7% das cadelas que apresentavam tumores mamários malignos, não sendo observada esta característica em tumores mamários benignos nem em tecido mamário normal. Neste estudo, ao contrário do que se foi observado em humanos, constataram um aumento na sobrevida das cadelas com tumores mamários malignos, conforme ilustra o gráfico 4.

Gráfico 4: Relação entre a superexpressão da proteína HER-2 e sobrevida em cadelas com câncer de mama.

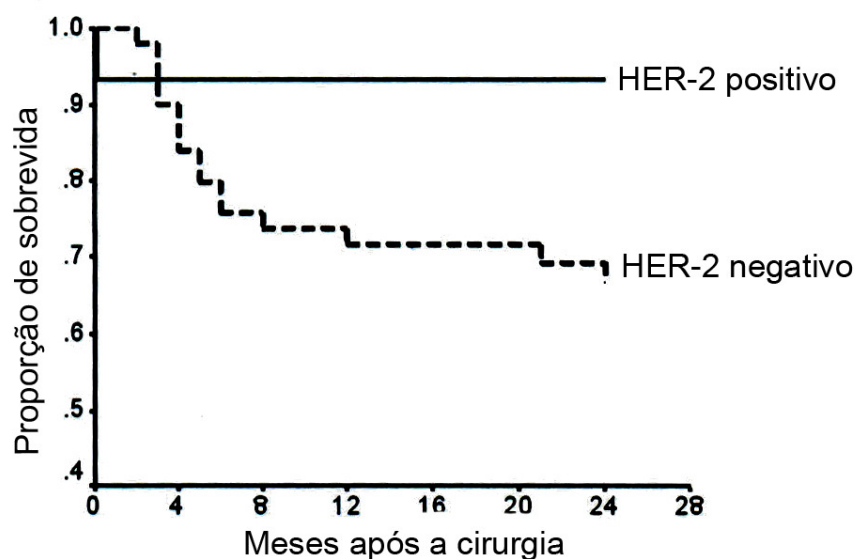


Gráfico 4: Curva de Kaplan-Meier mostrando a relação entre a superexpressão da proteína HER-2 e sobrevida em cadelas com câncer de mama (modificado de: HSU et al., 2009).

GAMA et al (2008a) encontraram um prognóstico favorável num grupo de tumores mamários caninos com superexpressão da proteína HER-2 e consideraram que o significado prognóstico desta característica fenotípica nestes tumores ainda permanece obscuro na literatura.

3.1.16. Moléculas de adesão

Caderinas são moléculas de adesão dependentes de cálcio, a E-caderina é a principal proteína envolvida com a adesão de células epiteliais. Liga-se a proteínas do citoesqueleto, em seu domínio intracelular. (NOLLET et al., 1999).

A perda de expressão de E-caderina e de β -catenina, identificada pela técnica de imunohistoquímica em células tumorais de carcinomas mamários caninos, pode ser considerada um fator prognóstico desfavorável. BRUNETTI et al. (2005) observaram que, em tumores onde esta perda de expressão ocorreu, foi observada maior invasividade, apesar de não haver redução da sobrevida ou alteração na proliferação celular, quando comparados com tumores que apresentaram expressão normal destas proteínas em suas células.

MATOS et al., (2007) observaram não só maior invasividade das células neoplásicas em tumores mamários caninos que apresentavam perda ou diminuição da expressão de E-caderina, como também maior índice de metástases em linfonodos pelo tumor primário.

GAMA et al. (2008b) observaram que a diminuição da expressão de E-caderina se relaciona com tumores maiores, com alto grau de malignidade, alto índice mitótico e metástases em linfonodos. Observaram também que a redução na expressão de β -catenina e E-caderina se relaciona com menor sobrevida e menor tempo livre de doença.

3.1.17. Mutação e superexpressão do gene p53

As mutações no gene p53 são frequentes em tumores mamários malignos da cadela e estão associadas com a progressão tumoral (VELDHOEN, 1999).

LEE et al. (2004) observaram que a superexpressão da proteína p53 foi considerada um fator prognóstico independente para menor tempo de sobrevida e aumento de recorrência tumoral. Os autores ainda encontraram positividade para a proteína p53 em algumas neoplasias benignas mamárias de cadelas e sugeriram que esta alteração poderia ser um fator de risco para o desenvolvimento de carcinoma.

3.1.18. Identificação de fenótipos moleculares de carcinomas mamários caninos

Na última década, na patologia mamária humana, surgiram novos conceitos sobre a patogênese de carcinomas mamários e sua correlação com o prognóstico, tendo como foco o seu perfil genético (PEROU et al., 2000, SORLIE et al., 2001). Como resultado destes estudos, foram definidos pelo menos cinco subtipos de tumores: carcinoma do tipo “basal-like”, luminal A, luminal B, HER2 + e carcinoma do tipo mama normal, percebendo-se que estas neoplasias correspondem a diversas doenças em relação à sua apresentação clínica, morfologia, perfil molecular e resposta à terapia (RAKHA et al., 2009).

Há poucos estudos sobre os tipos moleculares de carcinomas mamários caninos na literatura (GAMA et al., 2008a, SASSI et al., 2010).

GAMA et al. (2008a) estudaram tumores mamários caninos malignos (carcinoma simples, carcinoma complexo e carcinossarcoma), utilizando um painel de imunohistoquímica envolvendo anticorpos para RE, HER2, citoqueratina 5 (CK5), proteína p63 (p63), P-caderina e Ki-67.

Os resultados das frequências dos subtipos identificados estão representados na tabela 4 e a relação destes subtipos com o tipo histológico e grau histológico está representada na tabela 5.

Tabela 4: Frequência de subtipos de carcinomas mamários caninos definidos pela imunohistoquímica.

SUBTIPO	RE	HER-2	P-caderina e/ou P63 e/ou CK5	Frequência (%)
Luminal A	Positivo	Negativo	Positivo/negativo	43 (44,8%)
Luminal B	Positivo	Positivo	Positivo/negativo	13 (13,5%)
“Basal-like”	Negativo	Negativo	Positivo	28 (29,2%)
Superexpressão HER-2	Negativo	Positivo	Positivo/negativo	8 (8,3%)
Fenótipo negativo/ nulo	Negativo	Negativo	Negativo	4 (4,2)

Modificado de: GAMA et al, 2008a.

Tabela 5: Associação entre subtipos moleculares de carcinomas mamários caninos, tipo histológico e grau histológico

	Luminal A [n(%)]	Luminal B [n(%)]	“Basal-like” [n(%)]	Super expressão HER-2 [n(%)]	p
TIPO HISTOLÓGICO					
Carcinoma simples	9 (23,1%)	8 (20,5%)	17 (43,6%)	5(12,8%)	<0,0001
Carcinoma complexo	32 (78%)	5 (12,2%)	3 (7,3%)	1 (2,4%)	
Carcinossarcoma	2 (16,7%)	0 (0%)	8 (66,7%)	2 (16,7%)	
GRAU HISTOLÓGICO					
Grau I	14 (100%)	0 (0%)	0(0%)	0 (0%)	<0,0001
Grau II	23 (69,7%)	5 (15,2%)	3 (9,1%)	2 (6,1%)	
Grau III	6 (13,3%)	8 (17,8%)	25 (55,6%)	6 (13,3%)	

Modificado de: GAMA et al, 2008a.

A tabela 6 apresenta a associação entre a positividade para marcadores basais e os diferentes subtipos de carcinomas mamários caninos.

Tabela 6: Associação entre a positividade para marcadores basais e os diferentes subtipos de carcinomas mamários caninos.

	Luminal A [n(%)]	Luminal B [n(%)]	“Basal- like” [n(%)]	Superexpressão HER-2 [n(%)]	p
CK5					
positivo	36 (60%)	8 (13,3%)	11 (18,3%)	5 (8,3%)	0,001
negativo	7 (21,9%)	5 (15,6%)	17 (53,1%)	3 (90,4%)	
P63					
positivo	32 (53,3%)	13 (21,7%)	11 (18,3%)	4 (6,7%)	<0,0001
negativo	11 (34,4%)	0 (0%)	17 (53,1%)	4 (12,5%)	
P-caderina					
positivo	26 (56,5%)	10 (21,7%)	9 (19,6%)	1 (2,2%)	0,001
negativo	13 (31,7%)	3 (7,3%)	18 (43,9%)	7 (17,1%)	
Marcadores basais					
Todos negativos	21 (77,8%)	6 (22,2%)	0 (0%)	0 (0%)	< 0,0001
Um positivo	11 (39,3%)	6 (21,4%)	8 (28,6%)	3 (10,7%)	
Dois positivos	5 (20%)	1 (4%)	15 (60%)	4 (16%)	
Todos positivos	2 (25%)	0 (0%)	5 (62,5%)	1 (12,5%)	

Modificado de: GAMA et al, 2008a.

GAMA et al. (2008a) observaram a partir destes achados que algumas características dos carcinomas caninos tiveram semelhança com as observados em carcinomas humanos. Os subtipos luminais correlacionaram-se com grau histológico baixo, menor invasividade e menor índice de proliferação celular. Os tumores que apresentaram superexpressão de HER-2 ou perfil “basal-like” relacionaram-se com alto grau histológico, invasão linfovascular, e alto índice de

proliferação celular. Concluíram também que os tumores com fenótipo “basal-like” apresentaram com maior frequência expressão para mais de um marcador para células mioepiteliais (CK5, p63 e P-caderina). Observaram ainda que todos os tumores do subtipo HER-2 apresentaram marcação para pelo menos um marcador para células mioepiteliais.

Ainda neste estudo, os autores observaram que o grupo de cadelas que apresentou maior sobrevida e tempo livre de doença foi o que apresentou superexpressão de HER-2, seguido do grupo de padrão luminal e, por último, o grupo com perfil fenotípico “basal-like”. Estes dados diferem do observado em humanos, onde o perfil HER-2 constitui um grupo de tumores associado a um prognóstico ruim (PEROU et al, 2000; SORLIE et al., 2001; SORLIE et al., 2003). Os autores consideraram que a superexpressão da proteína HER-2 nos tumores mamários caninos ainda tem um significado controverso na literatura.

Outro estudo recente sobre a classificação de tumores mamários baseada em seu perfil molecular (SASSI et al., 2010) envolveu 45 cadelas. Os autores utilizaram um painel de imunohistoquímica diferente do utilizado por GAMA et al (2008a) para a definição dos subtipos moleculares (Luminal A e B, HER-2 e “basal-like”): anticorpos para RE, RP, ERB-2, CK 5/6 e CK14. Para a definição do subtipo molecular, os autores utilizaram os critérios apresentados na tabela 7.

Tabela 7: Critérios para a definição de subtipos de carcinomas mamários caninos, baseada em seu perfil imunohistoquímico

SUBTIPO	RE/RP	HER-2	CK 5/6 e CK14	Frequência (%)
Luminal A	Positivo e/ ou positivo	Negativo	Positivo/ negativo	13 (28,8%)
Luminal B	Positivo e/ ou positivo	Positivo	Positivo/ negativo	22 (48,9%)
Superexpressão HER-2	Negativo	Positivo	Positivo/ negativo	0 (0%)
“Basal-like”	Negativo	Negativo	Positivo e/ ou positivo	10 (22,3%)

Modificado de: SASSI et al. 2010.

A tabela 8 apresenta a correlação entre os subtipos de carcinomas mamários em cadelas e seu tipo e grau histológico.

Tabela 8: Associação entre subtipos moleculares de carcinomas mamários caninos, tipo histológico e grau histológico

	Luminal-like A [n(%)]	Luminal-like B [n(%)]	“Basal-like” [n(%)]	Super expressão HER-2 [n(%)]	p
TIPO HISTOLÓGICO					
Carcinoma simples	6 (31,6%)	10 (52,6%)	3 (15,8%)	-	0,47
Carcinoma complexo/ em tumor misto	6 (24%)	12 (48%)	7 (28%)	-	
Outros	1 (100%)	0	0	-	
GRAU HISTOLÓGICO					
Grau I	9 (50%)	3 (16,7%)	6 (33,3%)	-	0,009
Grau II	2 (14,3%)	9 (64,3%)	3 (21,4%)	-	
Grau III	2 (15,4%)	10 (76,9%)	1 (7,7%)	-	

Modificado de: SASSI et al., 2010.

Neste estudo, SASSI et al. (2010) não observaram tumores com o perfil molecular HER-2 e atribuíram este fato ao pequeno número de casos estudados. Apesar dos subtipos moleculares dos carcinomas mamários se correlacionarem com o grau histológico, não foi observada correlação com o tipo histológico ou com invasividade.

Ao contrário do observado por GAMA et al. (2008a), os autores observaram que os carcinomas mamários caninos do subtipo luminal apresentaram sobrevida menor que o subtipo “basal-like”. Os autores atribuíram esta discrepância ao fato de terem utilizados anticorpos diferentes para a caracterização do subgrupo “basal-like”. Neste estudo os autores questionam a aplicabilidade da comparação

entre tumores mamários humanos e caninos e sugerem que mais estudos seriam necessários para estabelecer uma correlação entre os subtipos moleculares apresentados nos carcinomas de cada espécie.

3.1.19. Carcinomas com perfil “basal-like”

A partir de vários trabalhos na literatura sobre características genéticas (PEROU et al., 2000; SORLIE et al., 2001) e imunofenotípicas (NIELSEN et al., 2004; RAKHA et al., 2006, RAKHA et al., 2007) de tumores mamários em humanos, foi identificado um grupo de neoplasias que possuíam características semelhantes às células mioepiteliais e que apresentavam um prognóstico desfavorável.

O subgrupo de carcinomas “basal-like” da mama humana, como definidos por estes autores citados acima, apresenta um comportamento clínico mais agressivo. Estas lesões expressam queratinas basais, como as citoqueratinas 5/6 e citoqueratina 17, positividade para EGFR (HER1/c-erbB1) e c-KIT (CD117) além de serem tipicamente negativos para receptores de estrógeno e para a expressão do gene HER2 (NIELSEN et al., 2004). Correspondem entre 2 a 18% de todos os carcinomas mamários e podem apresentar tipos histológicos variados, como ductal (SOE), medular, adenóide cístico e metaplásico (RAKHA et al., 2006). Em relação ao seu comportamento clínico, apresentam preferencialmente disseminação pela via hematogênica, com uma peculiar preferência de metástases para cérebro e pulmões (TSUDA et al., 2000). Alguns estudos, como os de CHEANG et al. (2008), sugerem painéis de imunohistoquímica que definam o subgrupo de carcinomas “basal-like”, propondo a utilização de receptor de estrógeno, receptor de progesterona, HER2, EGFR e citoqueratina 5/6.

Este grupo, denominado “basal-like” carcinoma, foi recentemente reconhecido em tumores mamários caninos (GAMA et al., 2008a), por meio de técnicas de imunohistoquímica. Neoplasias com o perfil “basal-like” apresentaram também sobrevida e tempo livre de doença menores, quando comparados aos outros tipos de carcinoma envolvidos no estudo.

Em contrapartida, SASSI et al. (2010), num estudo semelhante ao citado acima, avaliaram 45 carcinomas mamários caninos que o grupo identificado com

o perfil “basal-like” apresentou sobrevida maior que os outros subtipos identificados (“luminal A” e “luminal B”). Os autores consideraram que a causa da divergência de resultados em relação ao estudo de GAMA et al. (2008a) poderia ser atribuída a diferenças entre os anticorpos utilizados no painel de imunohistoquímica nos dois estudos.

3.2. Tumores mistos da mama da cadela

Segundo MISDORP et al., 1999, os tumores mistos da mama da cadela correspondem à proliferação de células morfológicamente similares a elementos epiteliais (luminais ou mioepiteliais) e células mesenquimais que podem produzir cartilagem e/ ou tecido ósseo e/ ou tecido adiposo, em combinação com tecido fibroso. De acordo com MOULTON (1990), as células mioepiteliais começam a proliferar na área entre o epitélio e a membrana basal e, em seguida, destacam-se da camada basal dos ductos mamários, formam massas e passam a sintetizar uma matriz pálida ou levemente basofílica. Estas células fazem protrusão para o estroma, promovendo distorção dos elementos epiteliais, comprimindo ductos e alvéolos mamários. As células mioepiteliais podem apresentar aspecto fusiforme ou estrelado e apresentam reação positiva para a pesquisa de fosfatase alcalina intracitoplasmática. Nas porções do tumor onde há similaridade morfológica com cartilagem hialina, a atividade de fosfatase alcalina não é demonstrável (MOULTON, 1990).

A cartilagem formada nos tumores mistos da cadela se apresenta formando nódulos ou placas de tamanhos variáveis. Tecido ósseo, quando observado, é representado por osteoclastos formadores osteóide e osso mineralizado, podendo ocorrer medula óssea com tecido hematopoético e tecido adiposo de permeio (MOULTON, 1990).

Conforme MISDORP et al., 1999, os correspondentes malignos do tumores mistos são os carcinomas ou os sarcomas em tumores mistos da cadela. Estes correspondem a neoplasias contendo focos de células malignas (epiteliais e/ ou mesenquimais), por vezes formando nódulos, que surgem em tumores mistos benignos e que podem invadir ou até mesmo substituir completamente a lesão benigna pré-existente, na época do exame histopatológico.

A origem dos diversos tipos de tecido que compõem os tumores mistos é um objeto de investigação e diversas teorias têm sido propostas. A teoria da origem monoclonal (conversão) sugere que os dois componentes (epitelial e mesenquimal) se originem de uma única célula progenitora pluripotente (*stem cell*) (HELLMÉN & LINDGREEN, 1989; GARTNER, 1999). Outra teoria que se apoia na origem monoclonal defende que as células mesenquimais se originem de metaplasia de células mioepiteliais (MOULTON, 1990). A teoria policlonal (colisão) defende que os elementos epiteliais e mesenquimais surjam a partir de diferentes clones tumorais (DIETRICH et al., 1997).

Os estudos que avaliam características moleculares e fatores prognósticos nos carcinomas em tumores mistos são escassos na literatura, resumindo-se em estudos sobre carcinomas mamários da cadela em geral, onde são especificadas as características de cada tipo histológico. Desta forma, o número de casos estudados é pequeno, constituindo parte da casuística. A tabela 9 sintetiza alguns dos principais dados:

Tabela 9: Características moleculares e fatores prognósticos dos carcinomas em tumores mistos apresentados na literatura

FONTE	Número de casos	Características
RUNGSIPAT et al., 1999	6	Positividade para HER2 em 0%; positividade para p53 em 16,6% dos casos
KARAYANNOPOULOU et al., 2005	18	Grau histológico I em 55,6% dos casos; II em 38,8% dos casos e III em 5,6% dos casos
MARTÍN DE LAS MULAS et al., 2005	44	Positividade para RE em 31,8% dos casos; positividade para RP em 77,2% dos casos; positividade para ambos receptores em 29,5% dos casos
DUTRA et al., 2008	10	Grau histológico I em 70% dos casos; II em 30% dos casos e III em 0% dos casos.
BERTAGNOLLI et al. 2009	19	Positividade para p53 em 5,3% dos casos; positividade para p63 em 100% dos casos
GAMA et al., 2009	7	Positividade para EGFR em 71,4% dos casos
SASSI et al., 2010	25	Carcinomas do tipo luminal A em 24% dos casos, luminal B em 48% dos casos e “basal-like” em 28% dos casos

3.3. O carcinoma metaplásico da mama humana

GENELHU et al. (2007) compararam o carcinoma em tumor misto da cadela ao carcinoma metaplásico da mama humana.

O carcinoma metaplásico corresponde a um grupo heterogêneo de tumores, correspondendo a menos de 1% de todos os carcinomas invasores da mama (REIS-FILHO et al., 2005). Este termo é utilizado quando se identificam neoplasias malignas contendo componentes epiteliais entre componentes mesenquimais, ou carcinomas escamosos primitivos dos elementos ductais, ou ainda adenocarcinoma com metaplasia escamosa (TSE et al., 2006). Os carcinomas metaplásicos frequentemente apresentam um prognóstico desfavorável, sendo que metástases à distância são freqüentes, mesmo quando os linfonodos regionais não estão acometidos (LUINI et al., 2007).

Cinco subtipos de carcinoma metaplásico foram descritos: carcinoma produtor de matriz (WARGOTZ & NORRIS, 1989a), carcinoma de células fusiformes (WARGOTZ et al., 1989b), carcinosarcoma (WARGOTZ & NORRIS, 1989c), carcinoma de células escamosas de origem ductal (WARGOTZ & NORRIS, 1990a) e carcinoma metaplásico com células gigantes osteoclásticas (WARGOTZ & NORRIS, 1990b). As características observadas nestes cinco subtipos estão resumidas nas tabelas 10 a 14.

Tabela 10: Carcinoma metaplásico produtor de matriz:
características clínico-morfológicas.

	Descrição
Características morfológicas	Produz abundante matriz estromal cartilaginosa e/ ou óssea, mas o componente de células fusiformes é ausente na transição entre as células malignas e a matriz. Também são ausentes células gigantes osteoclasticas. Pode haver focos de metaplasia escamosa ou apócrina. Tipo predominante – colóide. Pode ter atipias nos componentes mesenquimais. Matriz mixóide: cora metacromaticamente pelo Alcian Blue e aldeído-fucsina, PAS diastase resistente e hialuronidase (condroitin sulfato e mucopolissacarídeos sulfatados).
IHQ	Componente epitelial: queratina (policlonal), EMA, S100. Raramente vimentina. RE: positivo em apenas três casos pesquisados. Componente estromal: S100, vimentina, queratinas e EMA variável. (Não cita porcentagens).
Nº de casos	26
Idade	35-84, mediana 60 anos.
Tamanho	0,5 a 12 cm – diâmetro médio 3,9 cm.
Bordas (microscopia)	85% bordas predominantemente circunscritas.
Grau nuclear	I: 35%, II: 30%, III: 35%
Índice mitótico	-----
Estadiamento	Metástases para linfonodos em apenas um caso (4%). Ausência de metástases à distância.
Sobrevida	4 meses a 22 anos (média 8,4 anos). Recorrência ou metástases em 35% (2,5 anos). Morte em 89% por metástases (4 anos). Sobrevida cumulativa em 5 anos: 68%

WARGOTZ & NORRIS, 1989a.

Tabela 11: Carcinoma metaplásico de células fusiformes:
características clínico-morfológicas.

	Descrição
Características morfológicas	Predomínio de células fusiformes, semelhante a um sarcoma de baixo grau, ou fascíte, ou tecido de granulação. Células monótonas, com núcleos ovalados proeminentes, formando arranjos estoriformes, fasciculares ou ondulados, entre feixes de colágeno denso. Presença de estroma mixóide. O componente fusiforme compreendeu mais da metade da lesão e frequentemente mais de 80% da lesão. Lesões sem evidências de carcinoma podem ser incluídos neste grupo, desde que as células sejam positivas para citoqueratinas. A presença de células gigantes osteoclásticas exclui o diagnóstico de CM de células fusiformes. Apenas 48% dos tumores apresentaram componente fenotípico epitelial. Carcinoma intraductal foi identificado em 7% dos casos.
IHQ	98% positivo para CK (policlonal). 77% para CK AE1/3. 11% positivo para EMA. 91% de positividade para vimentina. 51% de positividade para S100. 96% de positividade para actina. RE: positivo em um caso.
Nº de casos	100
Idade	29- 95, mediana 65 anos.
Tamanho	0,6- 21 cm – diâmetro médio 4,4 cm.
Bordas (microscopia)	49% bordas infiltrativas, 18% circunscritas e 31 combinação entre bordas nodulares com áreas infiltrativas.
Grau nuclear	I: 70%, II: 28%, III: 2% (pequenos focos)
Índice mitótico	0 a 11/ HPF (mediana 1) – no componente fusiforme.
Estadiamento	Metástases em 6% dos casos. Alguns com padrão fusiforme, outros com padrão de carcinoma.
Sobrevida	Sobrevida cumulativa em 5 anos: 64%

WARGOTZ *et al.*, 1989b.

Tabela 12: Carcinoma metaplásico - carcinosarcoma:
características clínico-morfológicas.

	Descrição
Características morfológicas	Tumores bifásicos compostos por epitélio maligno (carcinoma) e estroma maligno (sarcoma). Altamente celulares, pleomórficos e mitoticamente ativos. O componente de células fusiformes deve compor pelo menos 50% da neoplasia e correspondeu a mais de 75% da lesão. Carcinomas com células osteoclásticas ou com transição direta para tecido cartilaginoso ou ósseo estão excluídos desta classificação. O componente <i>in situ</i> , quando presente, foi de carcinoma, em sua maioria pouco ou moderadamente diferenciado. Não foi encontrado componente sarcomatoso intraductal. Diferenciação escamosa do carcinoma foi observada em 21% dos casos, sendo a forma exclusiva em dois casos. O componente sarcomatoso infiltrou-se no componente carcinomatoso na interface entre os dois componentes. O sarcoma foi pleomórfico em 57% dos casos e fibrossarcomatoso em 40% dos casos. Outros componentes menores: sarcoma pleomórfico (11%), fibrossarcoma (11%), rabdomiossarcoma (11%), rabdomiossarcoma (3%) e estroma angiomixóide (3%). A lesão era hiper celular em 97% dos casos.
IHQ	Componente carcinomatoso: Vimentina 1%, S100 14%. Actina 13%. RE: realizado em apenas 11 casos – 1% de positividade. RP: 1% (o mesmo caso do RE) Componente sarcomatoso: 55% reativo para citoqueratinas (policlonal). (6 difusamente, 6 intermediário, 4 focal e 6 raro). Destes, apenas 80% foram positivos para CK AE1/3. EMA: 21%, 98% positivo para vimentina. S100 (60%). Actina: 77%
Nº de casos	70
Idade	29- 95 anos, mediana 56 anos.
Tamanho	0,9 – 19 cm – diâmetro médio – 6,3 cm
Bordas (microscopia)	46% com bordas infiltrativas, 21% com bordas nodulares e 33% apresentavam os dois padrões intercalados.
Grau nuclear	I:0% , II:27% , III: 73%
Índice mitótico	5 a 116 HPF (mediana 27) – no componente sarcomatoso.
Estadiamento	49% de metástases em linfonodos.
Sobrevida	Recorrência subsequente em 60% dos casos. 54% das pacientes tiveram morte subsequente pelo tumor (metástases). Sobrevida cumulativa em 5 anos: 49%.

WARGOTZ & NORRIS, 1989c.

Tabela 13: Carcinoma metaplásico de células escamosas:
características clínico-morfológicas.

	Descrição
Características morfológicas	Tumor composto exclusivamente (*) por células escamosas malignas não envolvendo a pele adjacente. Pode haver componente <i>in situ</i> ductal ou lobular, desde que o componente invasor seja escamoso. Carcinoma de células escamosas com predomínio do componente de células fusiformes (>50%) deve ser denominado carcinoma (metaplásico) de células fusiformes. 72% apresentaram-se com aspecto cístico.
	(*) Três dos 22 casos apresentaram componente de células fusiformes, porém constituiu menos de 25% do tumor e foram classificados como carcinoma metaplásico variante de células escamosas. Nos casos estudados, não houve metaplasia cartilaginosa ou óssea.
IHQ	O diagnóstico diferencial com carcinoma mucoepidermóide deve ser feito, se necessário, com a coloração pelo PAS. 70% positivo para S100. Os tumores negativos para S100 eram positivos para actina em raras células. RE positivo em um dos casos, com baixa expressão, mas apenas duas lesões foram testadas para este receptor. RP negativo e feito em apenas uma lesão, onde não foi testado RE.
Nº de casos	22
Idade	31 a 83 anos, mediana 52
Tamanho	1,5 a 12 cm, 3,9 cm de diâmetro médio.
Bordas (microscopia)	Margens macroscópicas nodulares com áreas irregulares.
Grau nuclear	I: 40%, II: 40%, III: 20%
Índice mitótico	Mitoses atípicas foram facilmente observadas.
Estadiamento	10% de metástases em linfonodos axilares e 5% em linfonodo supraclavicular (uma paciente, sendo que esta apresentava axila negativa). Apresentou tendência a metastatizar para outras cadeias de linfonodos “saltando” a cadeia axilar.
Sobrevida	Sobrevida cumulativa em 5 anos: 63%.

WARGOTZ & NORRIS, 1990a.

Tabela 14: Carcinoma metaplásico de células gigantes osteoclásticas:
características clínico-morfológicas.

	Descrição
Características morfológicas	Componente de células gigantes osteoclásticas em carcinoma metapásico, podendo este ser com estroma fusocelular, sarcomatoso, acompanhado de componente adenocarcinomatoso ou de carcinoma escamoso. Padrão morfológico das células osteoclásticas: Localização próxima à cartilagem ou osso sem mistura com o componente carcinomatoso. Numerosos núcleos arredondados, frequentemente localizados na porção central do citoplasma. Núcleos geralmente regulares, aumentados de volume, irregulares e contendo nucléolos proeminentes. Foram observadas formas mononucleares e binucleares. Citoplasma eosinofílico, abundante. Figuras de mitose foram observadas. Foi observado osteóide e/ou osso com cartilagem em 28% dos casos, apenas cartilagem em 7% dos casos (estes componentes não são obrigatórios). Hemorragia foi freqüentemente observada com hemossiderina e vasos com paredes espessadas.
IHQ	Células gigantes osteoclásticas: negativas para queratinas, EMA e S100. Positividade para vimentina em alguns casos e positividade para actina em poucos casos.
Nº de casos	29
Idade	28- 81 anos, mediana 54
Tamanho	1,3 a 15 cm, diâmetro médio de 5,5 cm.
Bordas (microscopia)	Margens nodulares em 58%, irregulares em 17% e o restante não foi avaliado.
Grau nuclear	I: 24%, II: 14%, III: 62%
Índice mitótico	4 a 63 mitoses/ HPF (mediana 20)
Estadiamento	12% de metástases para linfonodos – um caso com metástases apenas do componente carcinomatoso e outro caso dos componentes estromal e carcinomatoso.
Sobrevida	Sobrevida cumulativa em 5 anos: 68%.

WARGOTZ & NORRIS, 1990b.

GOBBI et al (1999) descreveram uma variante do subtipo de carcinoma metaplásico de células fusiformes, chamado de “fibromatosis-like”, onde os autores observaram um prognóstico favorável, apesar de freqüentes recidivas locais.

Segundo REIS-FILHO et al. (2005), os carcinomas metaplásicos apresentam amplificação e superexpressão para EGFR, porém não mostram estas características para HER-2. Neste estudo os autores analisaram 25 carcinomas metaplásicos de mulheres e verificaram superexpressão de EGFR em 76% dos casos e amplificação do gene em 37% dos casos. Um dos casos

apresentou superexpressão da proteína HER2, porém não mostrou amplificação do gene *HER2*.

Em um outro estudo, REIS-FILHO et al. (2006) observaram ainda que os carcinomas metaplásicos apresentam um perfil imunohistoquímico semelhante ao carcinoma do subtipo “basal-like”. Neste estudo, envolvendo 65 casos de carcinomas metaplásicos humanos, os autores identificaram um fenótipo típico deste subtipo em 91% dos casos, ou seja, negatividade para RE e HER-2 e positividade para EGFR e/ou CK5/6.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi executado no Laboratório de Patologia Comparada do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (LPC/ ICB/ UFMG).

4.1. Seleção de casos

Realizou-se um estudo descritivo de casos, utilizando-se vinte e nove (n=29) amostras de carcinomas em tumores mistos da mama obtidos de cadelas de várias raças. As amostras foram provenientes de espécimes cirúrgicos oriundos do Hospital da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais e do (LPC/ ICB/ UFMG). Os critérios utilizados para o diagnóstico das lesões foram propostos por Misdorp et al. (1999).

Como critério de inclusão foi considerada a existência e a conservação de todos os blocos de parafina referentes a cada caso, com o diagnóstico prévio de carcinoma em tumor misto da mama da cadela.

Como critérios de exclusão, foram utilizados estado de conservação dos blocos de parafina, dúvidas diagnósticas, outros diagnósticos e casos com artefatos durante fixação e processamento.

O protocolo desenvolvido neste estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA), sob o protocolo nº 123/2009.

4.2. Processamento e avaliação histológica

Todas as amostras já haviam sido submetidas ao processamento histológico pelas técnicas de rotina e se encontravam incluídas em blocos de parafina. Em um dos blocos de cada caso, escolhido previamente como representativo da lesão, foram realizados seis cortes histológicos consecutivos

com 4 µm de espessura, um deles para a coloração pela hematoxilina e eosina (H&E) e os restantes para realização de técnicas de imunohistoquímica (vide abaixo). Nos blocos restantes de cada caso foi feito apenas um corte histológico que será corado pelo H&E.

Nos cortes corados em H&E, o componente epitelial maligno invasor foi classificado de acordo com MISDORP et al. (1999) e de acordo com WARGOTZ et al. (1989, 1990).

No componente epitelial maligno, foram observados os seguintes parâmetros: grau histológico (ELSTON & ELLIS, 1991), índice mitótico (Tabela 15), presença de necrose tumoral e presença de invasão vascular. Para a avaliação de invasão vascular, pesquisou-se a presença de êmbolos neoplásicos no interior de espaços revestidos por endotélio.

Tabela 15: Correlação entre o número de mitoses e índice mitótico de carcinomas.

Número de mitoses em 10 campos, objetiva de 40X *	Escore	Classificação
0 a 7	1	Baixo
8 a 16	2	Moderado
> 17	3	Alto

* Diâmetro do campo: 0,55 mm; Área do campo: 0,259mm².
DUTRA et al., 2008.

O componente epitelial maligno *in situ* foi classificado, segundo a Conferência de Consenso sobre a classificação do carcinoma ductal *in situ* (1997), em: comedocarcinoma, cribriforme, papilar, micropapilar e sólido. As lesões foram graduadas segundo LAGIOS (1990), em alto, intermediário e baixo graus.

No componente estromal foram avaliados os seguintes parâmetros: presença de matriz condróide e mixóide, presença de elementos mesenquimais

(cartilagem, tecido ósseo e medula óssea), além de investigação de características morfológicas de malignidade.

Todos os casos foram examinados por dois patologistas e os casos discordantes foram discutidos com um terceiro patologista, para consenso.

4.3. Reação de imunohistoquímica

Foram utilizadas lâminas previamente silanizadas e realizados cortes de 4 µm de espessura.

As reações de imunohistoquímica para marcação de RE, RP e CK5 foram realizadas no Laboratório de Patologia Investigativa do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A C Camargo (São Paulo) e as reações para marcação de HER2 e EGFR foram realizadas no LPC/ ICB/ UFMG.

Para a marcação de RE, RP e CK5 aplicou-se a recuperação antigênica em panela de pressão, em tampão citrato (pH 6,0), por quatro minutos. Após a recuperação antigênica, as lâminas foram imersas em peróxido de hidrogênio a 3%, durante 30 minutos (três banhos de dez minutos cada). Os cortes histológicos foram incubados em câmara úmida por 18 horas. Realizou-se amplificação pelo sistema Novolink® Max Polymer, (Novocastra) por 30 minutos à 37° C. A revelação foi feita utilizando-se diaminobenzidina (DAB).

Para a marcação de HER2 e EGFR aplicou-se recuperação antigênica em banho maria, com a solução Retrieval® (DAKO), em pH 6,0 durante 20 minutos, a 98°C. Após a recuperação antigênica, as lâminas foram imersas em peróxido de hidrogênio a 3% durante 15 minutos para o bloqueio da peroxidase endógena. Os cortes histológicos foram incubados em câmara úmida por 14 horas (*overnight*). Após a incubação, foi aplicado o sistema de amplificação por polímero não biotinilado Advance HRP Link® (DAKO). A revelação foi feita utilizando-se diaminobenzidina (DAB). Os anticorpos utilizados e suas especificações estão listados na tabela 16:

TABELA 16: Anticorpos do painel imunohistoquímico para carcinomas em tumores mistos da glândula mamária da cadela.

Anticorpo	Fabricante	Clone	Diluição	Marcação
RE	Dako	1D5	1:100	Núcleo
RP	Novocastra	IA6	1:20	Núcleo
HER2	Dako	A0485	1:180	Membrana
EGFR	Zymed	31G7	1:100	Membrana/ Citoplasma
CK 5	Novocastra	XM26	1:300	Citoplasma

Foram utilizados casos de tumores mamários caninos com positividade conhecida para cada marcador, como controle positivo da reação. O controle negativo foi obtido pela omissão do anticorpo primário.

4.4. Interpretação da imunorreatividade dos carcinomas em tumor misto da cadela

A imunorreatividade para RE e RP foi considerada positiva quando mais de 5% dos núcleos das células neoplásicas expressaram este marcador (MILLANTA et al, 2005). Para a interpretação da marcação para HER2, foi utilizado o padrão estabelecido pela Sociedade Americana de Oncologia Clínica/ Colégio Americano de Patologistas (WOLF et al., 2007). Para a avaliação da marcação para EGFR, foram considerados positivos os casos com marcação de membrana em 10% ou mais das células neoplásicas (RAKHA et al, 2007). Para a avaliação da marcação das CK5 foram considerados positivos os casos com marcação forte, citoplasmática ou de membrana, em mais de 1% das células tumorais (SASSI et al, 2010).

4.5. Definição do perfil molecular dos carcinomas em tumores mistos da cadela

Os perfis moleculares dos carcinomas examinados foram definidos da seguinte forma: Luminal A: (RE positivo e/ou RP positivo, HER2 negativo, independentemente do resultado de EGFR e CK5); Luminal B: (ER positivo e/ou RP positivo, HER2 positivo, independentemente do resultado de EGFR e CK5);

HER2: (RE negativo e RP negativo, HER2 positivo, independentemente do resultado de EGFR e CK5); “Basal-like”: (RE negativo e RP negativo, HER2 negativo e positividade para EGFR e/ ou CK5); mama normal (negativo para todos os marcadores) (NIELSEN et al., 2004, CAREY et al., 2006, GAMA et al., 2008).

4.6. Análise estatística:

Os dados coletados foram tabulados e submetidos a análise uni e bivariadas com o auxílio do *software Stata 9.0*, com o intuito de elaborar tratamento estatístico para responder às questões levantadas pela pesquisa.

A análise dos dados iniciou-se com a utilização de técnicas de análise descritiva, a saber, tabelas contendo a frequência absoluta e relativa para descrever as características morfológicas, fenotípicas e o perfil molecular dos casos observados.

Em seguida avaliaram-se possíveis associações entre as características observadas. Esta avaliação foi feita através de tabelas que cruzam as frequências observadas de casos dentro de cada uma das variáveis e do teste exato de Fisher, utilizado para avaliar a significância das associações observadas (Giolo, 2006).

Outro ponto importante diz respeito à existência de concordância entre o perfil molecular do componente *in situ* e do perfil molecular do componente invasor. Essa avaliação foi realizada através da proporção de avaliações concordantes e do índice de concordância de Kappa. Para verificar se a concordância observada é significativa, utilizou-se o teste de significância do coeficiente de concordância de Kappa.

Para determinar se existem associações estatisticamente significativas, bem como se a concordância é significativa, utilizou-se o nível de significância de 5%. Assim, consideraram-se como significativas as associações e concordâncias cuja probabilidade de significância do teste, p-valor, é menor que 0,05.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação histológica

5.1.1. Componente epitelial maligno *in situ*

Foi identificado componente epitelial maligno *in situ* em 15 dos 29 casos examinados (15,7%). A maioria do componente epitelial *in situ* das lesões estudadas foi do tipo histológico sólido (60%) e os graus histológicos mais frequentes foram II e I (73,3% e 20%, respectivamente) tabela 17 apresenta as frequências dos tipos histológicos identificados no componente epitelial maligno *in situ*.

Tabela 17: Tipo histológico do componente epitelial *in situ* do carcinoma em tumor misto da mama da cadela (n=15)

Classificação histológica	Frequência	%
Sólido/ cribriforme	3	20,0
Papilar/ micropapilar	1	6,7
Sólido	9	60,0
Micropapilar	2	13,3
Total	15	100,0

5.1.2. Componente epitelial maligno invasor

Todas as lesões estudadas apresentaram o diagnóstico histológico de carcinoma em tumor misto (MISDORP et al., 1999) e características morfológicas

compatíveis com carcinoma metaplásico produtor de matriz (WARGOTZ & NORRIS, 1989a).

A maioria das lesões estudadas revelou ser de baixo grau histológico (55,2%) e com baixo índice mitótico (72,4%). A tabela 18 apresenta a frequência dos graus histológicos e a tabela 19 mostra a frequência dos índices mitóticos identificados nos carcinomas invasores em tumor misto da cadela.

Tabela 18: Grau histológico do componente epitelial invasor do carcinoma em tumor misto da mama da cadela (n=29)

Grau	Frequência	%
Grau I	16	55,2
Grau II	10	34,5
Grau III	3	10,3
Total	29	100,0

Tabela 19: Índice mitótico do componente epitelial invasor do carcinoma em tumor misto da mama da cadela (n=29)

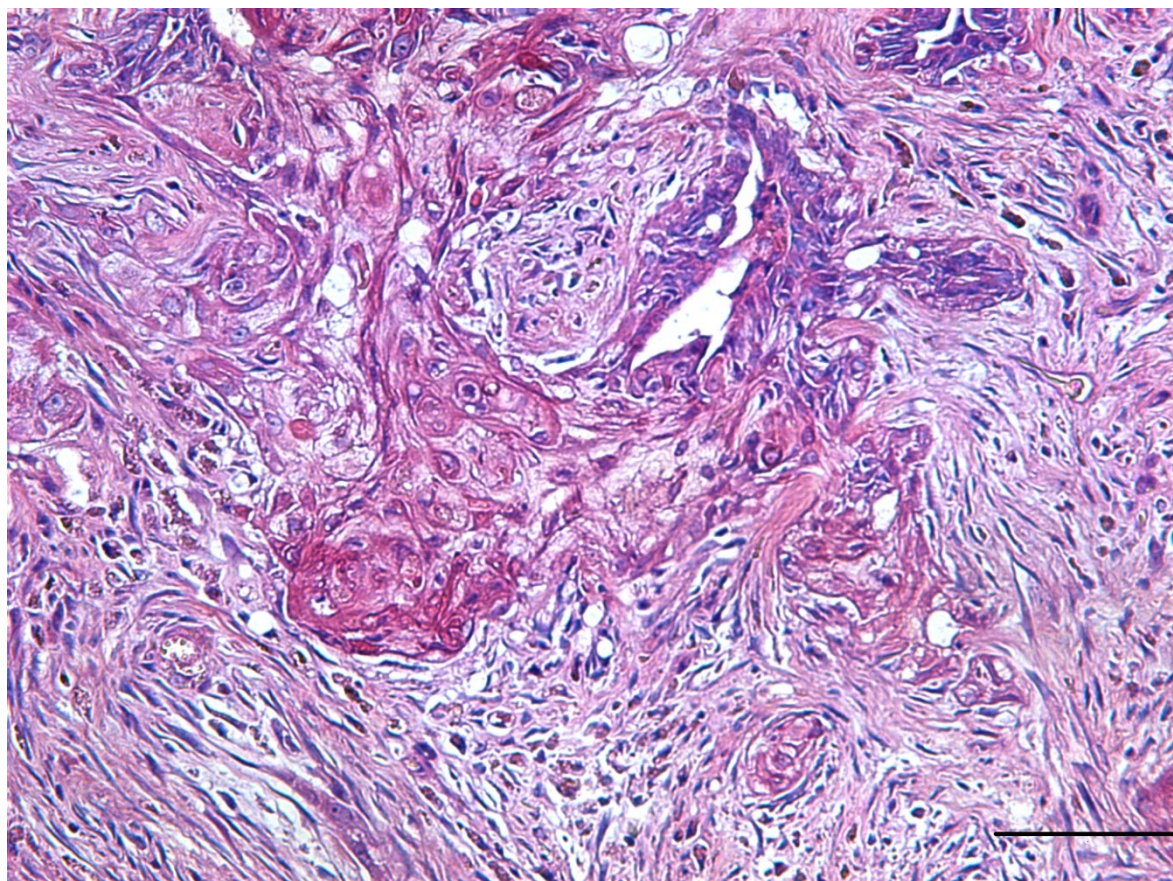
Índice mitótico	Frequência	%
Baixo	21	72,4
Moderado	6	20,7
Alto	2	6,9
Total	29	100,0

Foi observada necrose em sete (24,1%) casos, focal e discreta em todos eles.

Não foi identificada invasão vascular em nenhum dos casos examinados.

Foi observada metaplasia escamosa do componente epitelial invasor em um caso (3,4%) (Figura 1).

Figura 1: Foco de metaplasia escamosa em carcinoma em tumor misto da cadela (barra: 100 μ m)).



5.1.3. Componente mesenquimal

Não foram observadas alterações compatíveis com transformação maligna no componente mesenquimal em nenhuma das lesões.

Observou-se apenas matriz mixóide em 10 casos (34,5%) e matriz mixóide e condróide em 19 casos (65,5%). As figuras 2 e 3 ilustram estes elementos.

Figura 2: Matriz mixóide apresentado estroma frouxo e basofílico, contendo células fusiformes e fibras delicadas (H&E, barra: 100µm).

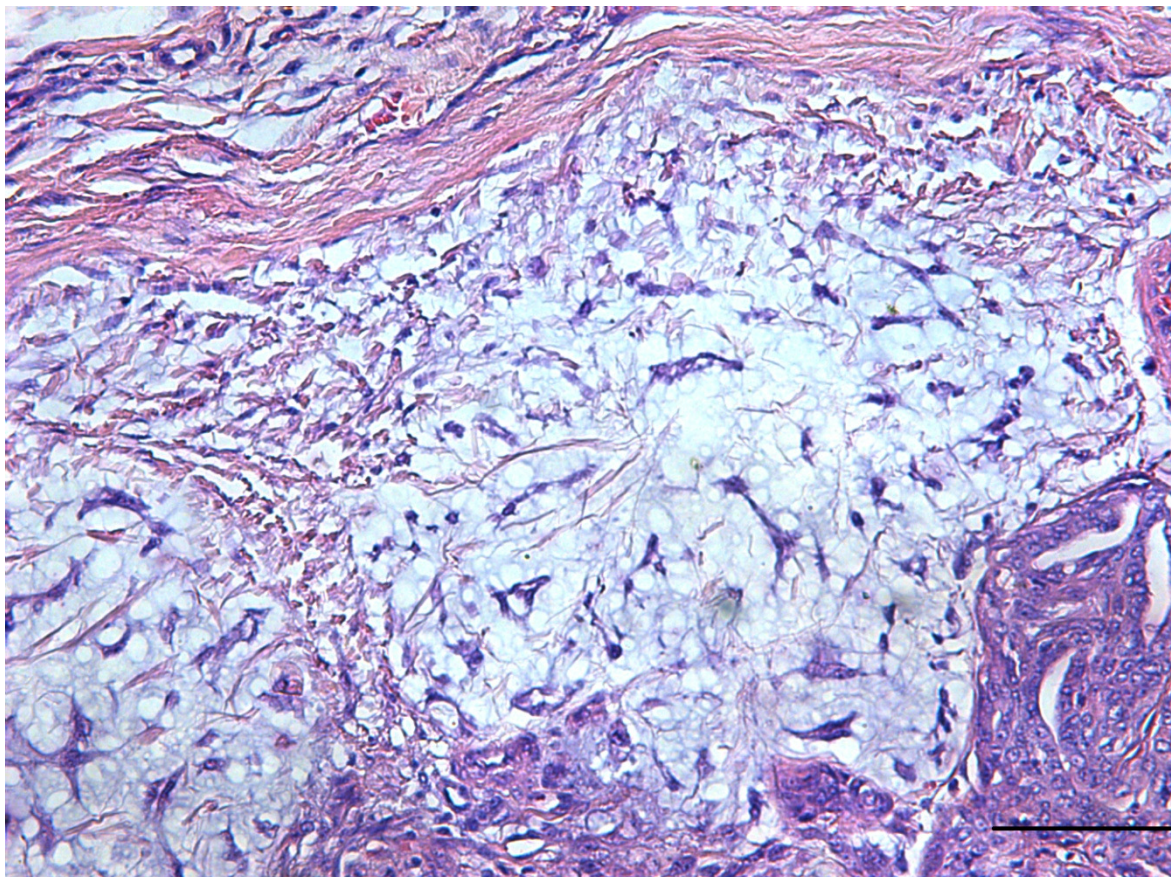
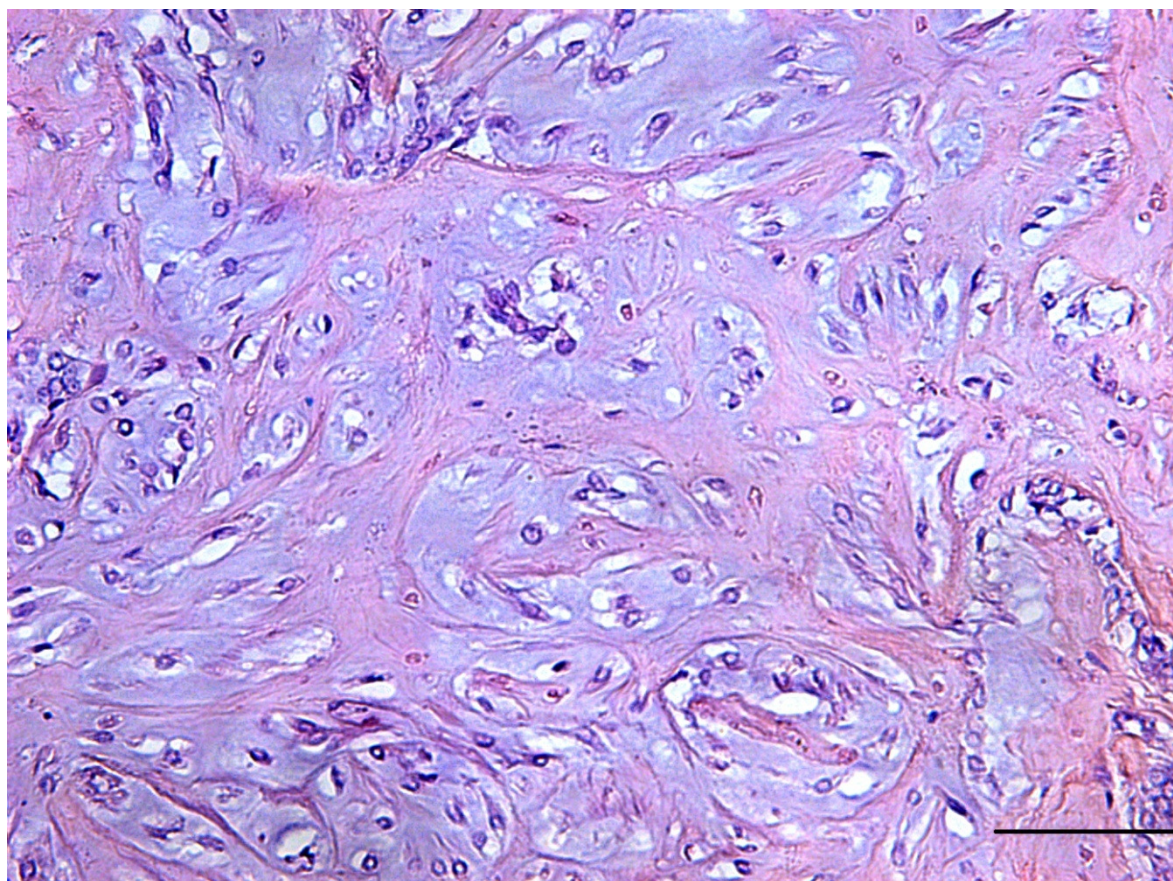


Figura 3: Matriz condróide, mostrando estroma mais densamente basofílico e homogêneo. As células se organizam em ninhos, são fusiformes ou arredondadas, com morfologia semelhante a condroblastos e condrócitos, respectivamente (H&E, barra: 100µm).

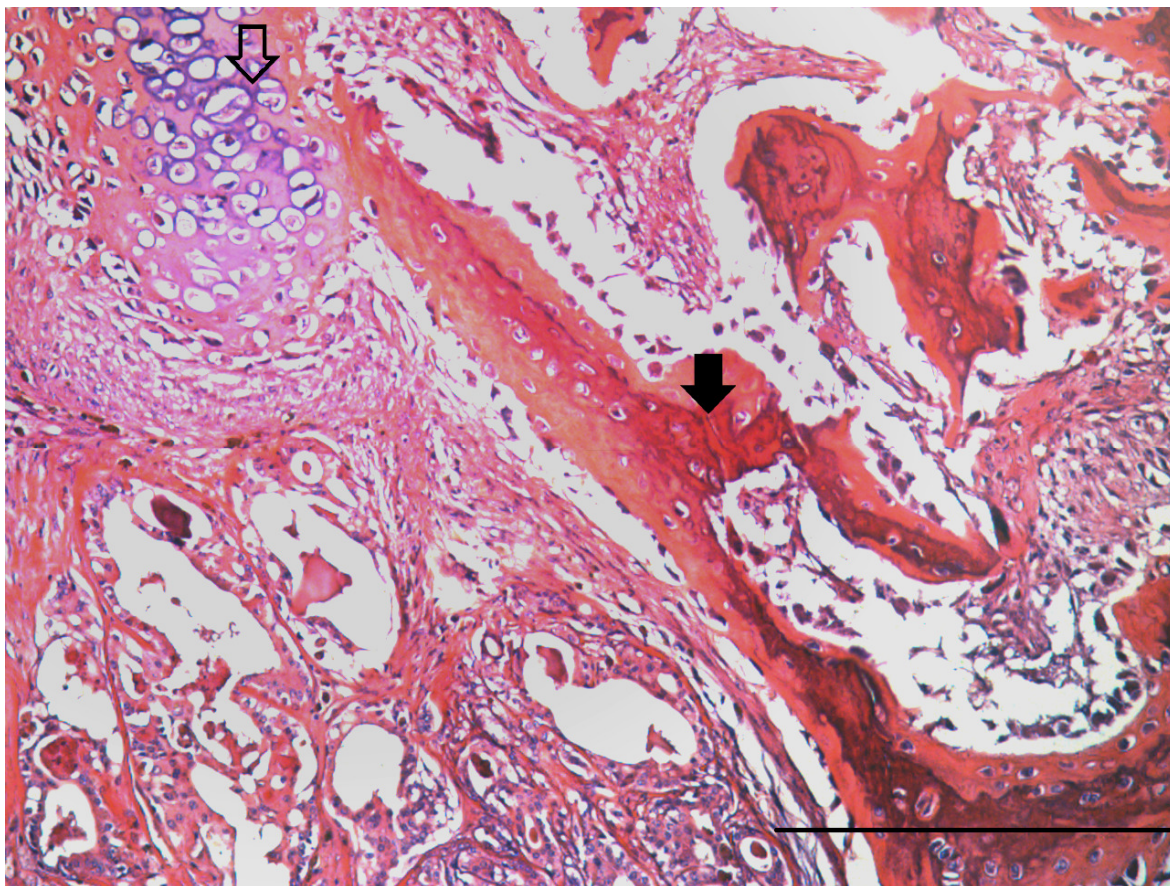


A tabela 20 apresenta a frequência dos tecidos encontrados no componente mesenquimal observado nas lesões e a figura 4 ilustra alguns destes componentes.

Tabela 20: Tipo de tecidos encontrados no componente mesenquimal do carcinoma em tumor misto da cadela (n=29)

Componentes mesenquimais	Frequência	%
Apenas matriz	19	65,6
Matriz e cartilagem	4	13,8
Matriz, cartilagem e osso	3	10,3
Matriz, cartilagem, osso e medula óssea	3	10,3
TOTAL	29	100,0

Figura 4: Componente mesenquimal do carcinoma em tumor misto: cartilagem madura (seta vazia) e tecido ósseo maduro (seta cheia). Não se observam sinais de malignidade (H&E, barra: 100µm).



5.2. Interpretação da imunorreatividade dos carcinomas

5.2.1. Imunorreatividade do componente epitelial maligno *in situ*

Houve um predomínio do perfil Luminal A (9 casos, 60,0%), seguido do perfil HER2 (3 casos, 20,0%). A Tabela 21 apresenta a síntese dos perfis imunofenotípicos encontrados nos carcinomas em tumores mistos da cadela.

Tabela 21: Distribuição segundo o perfil imunofenotípico do componente *in situ* do carcinoma em tumor misto da cadela (n=15)

Perfil imunofenotípico	n	%
Luminal A	9	60,0
HER2	3	20,0
Luminal B	2	13,3
“Basal-like”	1	6,7
TOTAL	15	100,0

5.2.2. Imunorreatividade do componente epitelial maligno invasor

Houve um predomínio do perfil Luminal A (12 casos, 41,4%), seguido do perfil “basal-like” (8 casos, 13,8%). A Tabela 22 apresenta a síntese dos perfis encontrados nos carcinomas em tumores mistos da cadela.

Tabela 22: Distribuição segundo o perfil imunofenotípico do componente invasor do carcinoma em tumor misto da cadela (n=29)

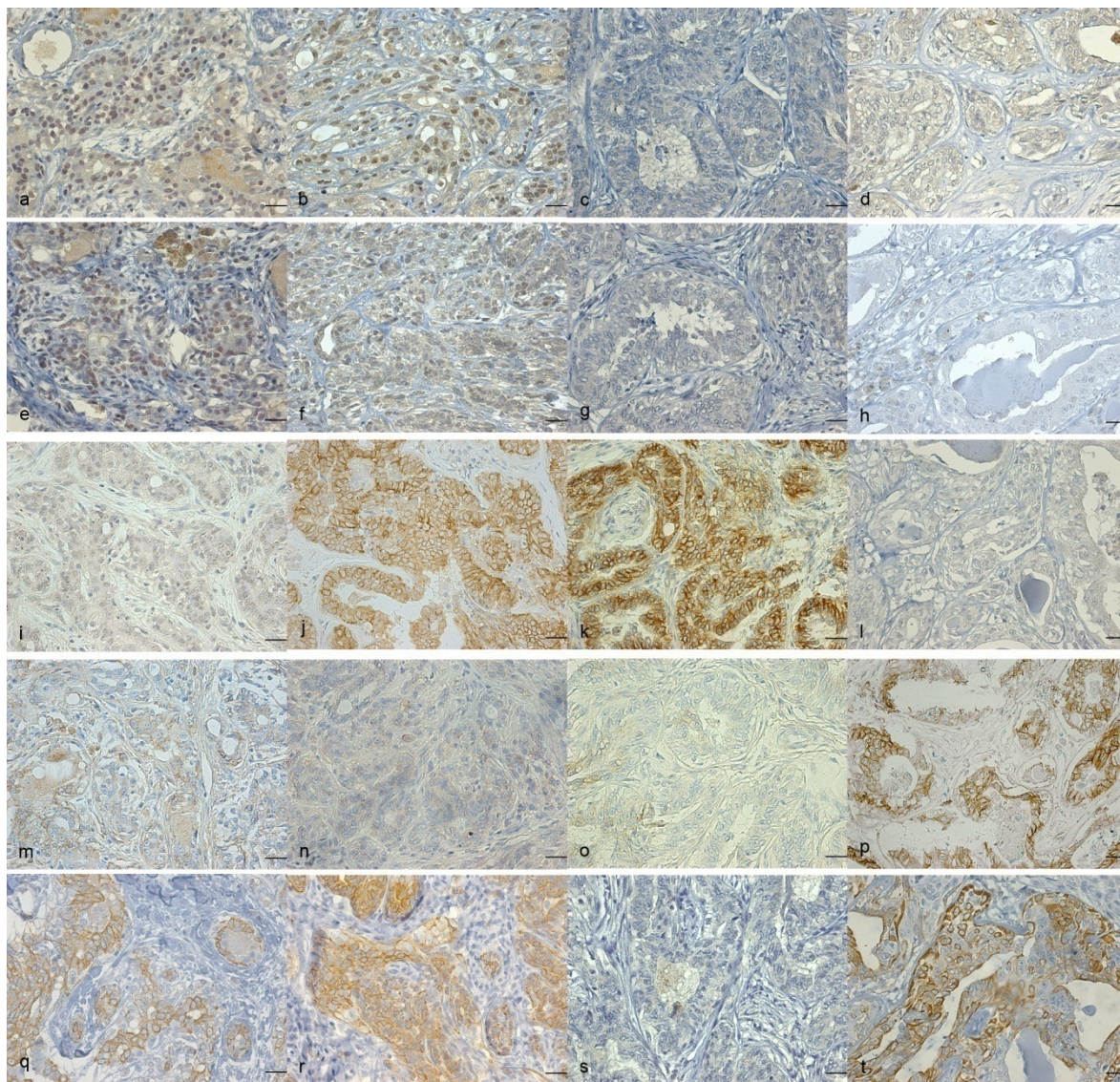
Perfil imunofenotípico	Frequência	%
Luminal A	12	41,4
“Basal-like”	8	27,6
HER2	5	17,2
Luminal B	4	13,8
TOTAL	29	100,0

A figura 5 exemplifica casos com os diversos perfis imunofenotípicos encontrados.

Observou-se positividade para pelo menos um marcador de células mioepiteliais (CK5 e/ou EGFR) em 27 casos (93,1%). Houve positividade para os dois marcadores em 15 casos (55,6%), marcação para apenas CK5 em 10 casos (37,0%) e marcação apenas para EGFR em 2 casos (7,4%).

Não foi observada correlação estatisticamente significativa entre os perfis imunofenotípicos identificados no componente epitelial maligno do carcinoma em tumor misto da cadela e o grau histológico ($p=0,735$) ou índice mitótico ($p=0,076$).

Figura 5: Expressão imunohistoquímica das diferentes proteínas estudadas no carcinoma em tumor misto da cadela: a-d: RE; e-h RP; i-l: HER2; m-p: EGFR; q-t: CK5. Cada coluna representa um subtipo molecular. Da direita para a esquerda: Luminal A, Luminal B, HER2 e “basal-like” (barra: 25µm).



Os casos de carcinomas invasores onde o componente *in situ* não foi identificado (n=14) apresentaram os seguintes perfis imunofenotípicos: Luminal A: 7 casos (50%), “Basal-like”: 5 casos (35,8%), Luminal B: 1 caso (7,1%) e HER2: 1 caso (7,1%).

Não houve marcação para nenhum dos anticorpos nos componentes mesenquimais das lesões estudadas.

5.2.3. Correlação entre o perfil imunofenotípico do carcinoma invasor em tumor misto da cadela e seus componentes mesenquimais.

Não houve associação significativa entre os perfis imunofenotípicos identificados no componente epitelial invasor e o padrão do estroma (mixóide ou mixóide/ condróide) ($p=0,773$).

Não houve associação significativa entre os perfis imunofenotípicos identificados no componente epitelial invasor e os tipos de tecidos observados no componente mesenquimal (apenas matriz, matriz e cartilagem, matriz, cartilagem e tecido ósseo, matriz, cartilagem, tecido ósseo e medula óssea) ($p=0,480$).

5.2.4. Concordância entre os perfis imunofenotípicos dos componentes epiteliais malignos *in situ* e invasor do carcinoma em tumor misto da cadela

A avaliação da concordância entre os perfis imunofenotípicos dos componentes epiteliais *in situ* (quando identificado, $n=15$) e invasor, através do cálculo do coeficiente de Kappa, mostrou-se elevada (coeficiente de Kappa = 0,816, $p<0,001$). A tabela 23 ilustra estes resultados.

Tabela 23: Concordância entre o perfil imunofetotípico do componente *in situ* e invasor no carcinoma em tumor misto da cadela ($n=15$)

Perfil (<i>in situ</i>)	Perfil (invasor)				Coeficiente de Kappa (P-valor)
	Luminal A	Luminal B	HER2	"Basal-like"	
Luminal A	5	0	0	1	0,816 ($<0,001$)
Luminal B	0	2	0	0	
HER2	0	1	4	0	
"Basal-like"	0	0	0	2	

6. DISCUSSÃO

A análise morfológica dos 29 casos de carcinoma em tumor misto da cadela revelou elementos epiteliais e mesenquimais semelhantes aos descritos no carcinoma metaplásico produtor de matriz da mama humana (WARGOTZ & NORRIS, 1989a). Em todos os casos houve representação de matriz mixóide ou condróide e mixóide, característica inerente ao diagnóstico. Em um caso apenas, houve representação de metaplasia escamosa do componente carcinomatoso e não foram observadas alterações malignas no componente estromal.

Observou-se que houve no componente epitelial maligno invasor um predomínio do grau histológico I (55,2%). Este achado não é concordante com os carcinomas metaplásicos produtores de matriz em humanos, descritos por WARGOTZ & NORRIS (1989a), onde foi observado um predomínio de carcinomas com grau II ou III, mostrando que o grau histológico do carcinoma em tumor misto da cadela apresenta características morfológicas que refletem prognóstico mais favorável que os carcinomas metaplásicos em humanos.

KARAYANNOPOULOU et al. (2005) apresentam frequências similares dos graus histológicos do carcinoma em tumor misto em seu estudo, quando comparados aos achados do atual trabalho.

Outros achados morfológicos demonstram o caráter pouco agressivo do carcinoma em tumor misto da cadela, como a ausência de invasão vascular, nos casos examinados, e a presença de escassa necrose que, quando presente, foi discreta e focal (24,1% dos casos).

Em relação ao estudo imunohistoquímico, observou-se que os carcinomas invasores foram caracterizados pela heterogeneidade de perfis, com predomínio do subtipo Luminal A (41,4%), seguido pelo subtipo “basal-like” (27,6%). REIS-FILHO et al. (2006) observaram que os carcinomas metaplásicos em humanos apresentavam um perfil imunohistoquímico “basal-like” em 91% dos casos. O perfil Luminal A, em humanos, foi descrito como um subtipo relacionado a um baixo grau histológico e excelente prognóstico (SORLIE et al., 2001). Estes

achados demonstram que o carcinoma em tumor misto da cadela apresenta características imunofenóticas diversas dos carcinomas metaplásicos em humanos e que provavelmente mais estudos são necessários para saber se são modelos adequados para o estudo em patologia comparada.

O imunofenótipo HER2 no componente epitelial maligno invasor dos casos do presente estudo (17,2%) é discordante com os achados de REIS-FILHO et al. (2005) em carcinomas metaplásicos da mama humana, onde houve superexpressão da proteína HER2 em apenas um caso (4%), não sendo identificada superexpressão do gene *HER2* em nenhum caso.

Em contrapartida, as porcentagens dos perfis imunofenóticos mais frequentes encontrados no componente epitelial maligno deste estudo (Luminal A - 41,4% e “basal-like” - 27,6%) são semelhantes aos encontrados no estudo imunofenotípico em tumores mamários da cadela (GAMA et al, 2008a), (Luminal A - 44,8% e “basal-like” - 29,2%). Apesar desta concordância, o estudo envolveu vários tipos de carcinoma e não houve nenhum caso de carcinoma em tumor misto da cadela.

Em outro estudo sobre o perfil imunofenotípico de carcinomas mamários em cadelas (SASSI et al., 2010), os autores estudaram, entre outros tipos histológicos de tumores, 25 casos de carcinomas complexos ou em tumor misto e o perfil imunofenotípico mais frequente foi o Luminal B (48%), seguido do subtipo “basal-like” (28%). Estes dados levam a crer que os carcinomas em tumor misto da cadela são um grupo heterogêneo de tumores, com perfis imunofenóticos variados.

SASSI et al. (2010) encontraram uma correlação entre o perfil imunohistoquímico dos carcinomas mamários em cadelas e o seu grau histológico, fato que não foi observado no atual trabalho. Uma possível explicação para o fato é o envolvimento de outros tipos de carcinomas mamários da cadela no estudo (43% dos casos eram de carcinomas de tipos diversos do carcinoma em tumor misto da cadela e o grupo que continha este tipo histológico apresentava também carcinoma complexo).

Em relação ao componente epitelial *in situ*, nos 15 casos onde foi identificado, observou-se predomínio do tipo sólido (60%) e o predomínio do grau histológico II (73,3%). Os perfis imunofenotípicos mais frequentes foram Luminal A (20,7%) e HER2 (17,2%). O predomínio do subtipo Luminal A é consistente com estudos de carcinoma *in situ* em humanos, onde este subtipo é também mais frequente, quando o componente epitelial invasor correspondente apresenta baixo grau histológico (TAMIMI et al., 2008). Uma possível explicação para o segundo perfil imunofenotípico mais frequente ser o HER2, no componente epitelial *in situ*, pode ser a alta prevalência da superexpressão da proteína HER2 e amplificação do gene *HER2* nos carcinomas *in situ* observados na mama humana (TAMIMI et al., 2008). Mesmo com estas diferenças, houve uma alta concordância entre os perfis moleculares dos componentes epiteliais *in situ* e invasor do carcinoma em tumor misto da cadela.

Observou-se positividade para pelo menos um marcador de células mioepiteliais (CK5 e/ou EGFR) em 27 casos (93,1%). Uma possível explicação para o fato seria a possível origem dos carcinomas mistos em células mioepiteliais (SASSI et al., 2010). GAMA et al. (2009) também encontraram uma alta positividade para EGFR em carcinomas em tumor misto (71,4%).

Os estudos contendo painéis de imunohistoquímica para definição do perfil imunofenotípico do carcinoma mamário em cadelas são escassos e conflitantes em alguns pontos, quando comparados entre si e quando comparados com as características clínico-patológicas dos correspondentes em humanos. Achados discordantes com a patologia mamária em humanos, como a sobrevida maior em indivíduos com carcinoma apresentando o perfil HER2 (GAMA et al, 2008a), ou a falta de correlação entre o perfil molecular e o tipo histológico (SASSI et al., 2010), entre outras questões, sinalizam que estudos contendo casuística maior e avaliando tipos similares de carcinomas com seguimento clínico, poderão ser úteis tanto para a escolha de tratamento adequado, como para definição de modelos experimentais úteis para a pesquisa em patologia comparada.

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados deste estudo, pode-se concluir que:

1. O carcinoma em tumor misto da cadela apresenta elementos morfológicos similares ao carcinoma metaplásico da mama humana (componente epitelial maligno invasor, matriz mixóide ou mixóide e condróide, além de elementos mesenquimais como cartilagem hialina, tecido ósseo e medula óssea);
2. O carcinoma em tumor misto da cadela apresenta em seu componente epitelial maligno invasor predomínio de características morfológicas de uma neoplasia de baixo grau histológico, tais como: pleomorfismo nuclear discreto, baixo índice mitótico, ausência de invasão vascular e escassa necrose;
3. O tipo histológico predominante do componente epitelial maligno *in situ* do carcinoma em tumor misto da cadela é sólido e de grau intermediário de malignidade;
4. O perfil imunofenotípico do componente epitelial maligno invasor do carcinoma em tumor misto da cadela é variado, com predomínio dos subtipos Luminal A e “basal-like”;
5. O perfil imunofenotípico do componente epitelial maligno *in situ* do carcinoma em tumor misto da cadela é variado, com predomínio dos subtipos Luminal A e HER2;
6. Não há correlação estatisticamente significativa entre o perfil imunofenotípico encontrado no componente epitelial maligno invasor do carcinoma em tumor misto da cadela com o grau de diferenciação do tumor, bem como com o índice mitótico;

7. Há concordância entre o perfil imunofenotípico (Luminal A, Luminal B, HER2, “basal-like” e mama normal) encontrado no componente *in situ* (quando houve) e o perfil imunofenotípico (Luminal A, Luminal B, HER2, “basal-like” e mama normal) encontrado no componente invasor do carcinoma em tumor misto da cadela.
8. A heterogeneidade dos perfis imunofenotípicos do carcinoma em tumor misto da cadela difere do perfil imunofenotípico predominante do carcinoma metaplásico da mama humana descrito na literatura (“basal-like”).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AHERN, T.E., CURTIS BIRD, R., CHURCH BIRD, A.E., WOLFE, L.G. Expression of the oncogene c-erbB-2 in canine mammary cancers and tumor-derived cell lines. *American Journal of Veterinary Research*. 57(5), 693-696, 1996.
2. APPLEBY, S.B., RISTIMAKI, A., RISTIMAKI, A., NEILSON, K., NARKO, K., HLA, T. Structure of the human cyclooxygenase-2 gene. *Biochemical Journal*. 302:723-727, 1994.
3. BERTAGNOLLI, A. C., CASSALI, G. D., GENELHU, M. C. L. S., COSTA, F. A., OLIVEIRA, J. F. C., GONÇALVES, P. B. D. Immunohistochemical Expression of p63 and Δ Np63 in Mixed Tumors of Canine Mammary Glands and Its Relation with p53 Expression. *Veterinary Pathology*, 46:407-415, 2009.
4. BOSTOCK, D.E., MORIARTY, J., CROCKER, J. Correlation between histologic diagnosis mean nuclear organizer region count and prognosis in canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*. 29:381-385, 1992.
5. BRUNETTI, B., SARLI, G., PREZIOSI, R., MONARI, I., BENAZZI, C. E-Cadherin and β -catenin reduction influence invasion but not proliferation and survival in canine malignant mammary tumors. *Veterinary Pathology*. 42:781-787, 2005.
6. CAREY, L.A., PEROU, C.M., LIVASY, C.A., DRESSLER, L.G., COWAN, D., CONWAY, K., KARACA, G., TROESTER, M.A., TSE, C.K., EDMISTON, S., DEMING, S.L., GERADTS, J., CHEANG, M.C.U., NIELSEN, T.O., MOORMAN, P.G., EARP, S.E., MILLIKAN, R.C. Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina Breast Cancer Study. *The Journal of the American Medical Association*. 295:2492-2502, 2006.
7. CASSALI, G.D. Aspectos morfológicos, imunohistoquímicos e citométricos de tumores mamários da cadela - aspectos comparativos com neoplasias da mama humana, 2000. 73p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Curso de Pós Graduação em Patologia, Universidade Federal de Minas Gerais.
8. CASSALI, GEOVANNI D., MELO, B.M., MADUREIRA, N., FERREIRA, E., BERTAGNOLLI, A. C., RIBEIRO, G.M., CAMPOS, C.B. Mammary gland diagnosis of the Laboratory of Comparative Pathology - UFMG, from 2000 to 2008. In: 34 World Small Animal Veterinary Association Congress, 2009, São Paulo. *Clínica Veterinária (Suplemento)*. São Paulo: Editora Guará. 14:173-173, 2009.
9. CHEANG, M.C., VODUC, D., BAJDIK, C., LEUNG, S., MCKINNEY, S., CHIA, S.K., PEROU, C.M., NIELSEN, T.O. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clinical Cancer Research*. 1(5):1368-76, 2008.

10. CONSAENSUS CONFERENCE ON THE CLASSIFICATION OF DUCTAL CARCINOMA *in situ*. Human Pathology. 28:1221-1225, 1997.
11. COSTA, C., SOARES, R., REIS FILHO, J.S., LEITÃO, D., AMENDOEIRA, I., SCHMITT, F.C. Cyclo-oxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. *Journal of Clinical Pathology*. 55:429-434, 2002.
12. DIETRICH, C.U., PANDIS, N., RIZOU, H., PETERSSON, C., BARDI, G., QVIST, H., APOSTOLIKAS, N., BOHLER, P. J., ANDERSEN, J. A., IDVALL, I., MITELMAN, F., HEIM S. Cytogenetic findings in phyllodes tumors of the breast: Karyotypic complexity differentiates between malignant and benign tumors. Human Pathology. 28:1379-1382, 1997.
13. DOBSON, J.M., SAMUEL, S., MILSTEIN, H., ROGERS, K., WOOD, J.L. CANINE neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *The Journal of Small Animal Practice*. 43:240-246, 2002.
14. DONNAY, I., DEVLEESCHOUWER, N., WOUTERS-BALLMAN, P., LECLERCQ, G., VERSTEGEN, J. Relationship between receptors for epidermal growth factor and steroid hormones in normal, dysplastic and neoplastic canine mammary tissues. *Research in Veterinary Science*. 60, 251-254, 1996.
15. DUTRA A.P., GRANJA N.V., SCHMITT F.C., CASSALI G.D. c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism. In: Canine mammary tumors. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 37:1673-1681, 2004.
16. DUTRA, A.P., AZEVEDO JUNIOR, G.M., SCHIMITT, F.C., CASSALI, G.D. Assessment of cell proliferation and prognostic factors in canine mammary gland tumors. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 60, 1403-1412, 2008.
17. ELSTON, C.W. & ELLIS, I.O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 19:403-410, 1991.
18. EVESON, J.W., KUSAFUKA, K., STENMAN, G., NAGAO, T. Pleomorphic adenoma. In: BARNES, L., EVESON, J.W., REICHART, P., SIDRANSKY, D. Pathologic and genetics. Head and neck tumours. World Health Organization Classification of Tumors. Lion: IARC Press, 254-258, 2005.
19. FERREIRA, E., BERTAGNOLLI, A.C., CAVALCANTI, M.F., SCHMITT, F.C., CASSALI, G.D. The relationship between tumor size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumors. *Veterinary and comparative oncology*. 7:230-235, 2009.

20. GAMA, A., ALVES, A. SCHMITT, F. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Archives*. 453:123-132, 2008.
21. GAMA, A., PAREDES, J., GÄRTNER, F., ALVES, A., SCHMITT, F. Expression of E-cadherin, P-cadherin and β -catenin in canine malignant mammary tumours in relation to clinicopathological parameters, proliferation and survival. *The Veterinary Journal*. 177: 45-53, 2008.
22. GAMA, A., GÄRTNER, F., ALVES, A., SCHMITT, F. Immunohistochemical expression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) in canine mammary tissues. *Research in Veterinary Science*. 87: 432-437, 2009.
23. GÄRTNER, F., GERALDES, M., CASSALI, G.D., REMA, A., SCHMITT F. DNA Measurement and immunohistochemical characterization of epithelial and mesenchymal cells in canine mixed mammary tumours: putative evidence for a common histogenesis. *The Veterinary Journal*. 158 (1): 39-47 1999.
24. GENELHU, M.C.L.S., CARDOSO S.V., GOBBI, H., CASSALI, G.D. A comparative study between mixed-type tumours from human salivary and canine mammary glands. *BMC Cancer*. 7:218, 2007.
25. GERALDES, M., GÄRTNER, F., SCHMITT, F. Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumors. *The Veterinary Record*. 146:403-436, 2000.
26. GILBERTSON, S.R., KURZMAN, I.D., ZACHRAU, R.E., HURVITZ, A.I., BLACK, M.M. Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Veterinary Pathology*. 20:127-142, 1983.
27. GOBBI, H, SIMPSON J.F., BOROWSKY, A., JENSEN, R.A., PAGE, D.L. Metaplastic breast tumors with a dominant fibromatosis-like phenotype have a high risk of local recurrence. *Cancer*. 15:2170-2182, 1999.
28. HELLMÉN E. & LINDGREEN, A. The expression of intermediate filaments in canine mammary glands and their tumors. *Veterinary Pathology*, 26:420-428, 1989.
29. HELLMÉN E., BERGSTRÖM R., HOLMBERG L., SPÅNGBERG I.B., HANSSON K, LINDGREN A. Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. *Veterinary Pathology*. 30:20-27, 1993.
30. HSU, W.L., HUANG, H.M., LIAO, J.W., WONG, M.L., CHANG, S.C. Increased survival in dogs with malignant mammary tumours overexpressing HER-2 protein and detection of a silent single nucleotide polymorphism in the canine HER-2 gene. *Veterinary Journal*. 180:116-123, 2009.

31. ITOH, T., UCHIDA, K., ISHIKAWA, K., KUSHIMA, K., KUSHIMA, E., TAMADA, H., MORITAKE, T., NAKAO, H., SHII, H. Clinicopathological survey of 101 canine mammary tumors: differences between small-breed dogs and others. *The Journal of veterinary medical science*. 67:345-347, 2005.
32. KARAYANNOPOULOU M., KALDRYMIDOU E., CONSTANTINIDIS T.C., DESSIRIS A. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. *Journal of Comparative Pathology*. 133:246-252, 2005.
33. KURZMAN, I.D. & GILBERTSON, S.R. Prognostic factors in canine mammary tumors. *Seminars in Veterinary Medicine & Surgery (Small Animal)*. 1:25-32, 1986.
34. LAGIOS, M.D. Duct Carcinoma in situ. Pathology and Treatment. *Surgical Clinics of North America*. 70: 853-871, 1990.
35. LAVALLE, G.E., BERTAGNOLLI, A.C., TAVARES, W.L.F., CASSALI, G.D. Cox-2 expression in canine mammary carcinomas: correlation with angiogenesis and overall survival. *Veterinary Pathology*. 46:1275-1280, 2009.
36. LEE, C.H., KIM, W., LIM, J.H., KANG, M.S., KIM, D.Y., KWEON, O.K. Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. *Journal of veterinary science*. 5:63-69, 2004.
37. LUINI, A., AGUILAR, M., GATTI, G., FASANI, R., BOTTERI, E., BRITO, J.A., MAISONNEUVE, P., VENTO, A.R., VIALE, G. Metaplastic carcinoma of the breast, an unusual disease with worse prognosis: the experience of the European Institute of Oncology and review of the literature. *Breast Cancer Research and Treatment*. 101:349-353. 2007.
38. MARTÍN DE LAS MULAS, J., ORDÁS J., MILLÁN, Y., FERNÁNDEZ-SORIA, V., RAMÓN Y CAJAL, S. Oncogene HER-2 in Canine Mammary Gland Carcinomas. *Breast Cancer Research and Treatment*. 80:363-367, 2003.
39. MARTÍN DE LAS MULAS J., MILLÁN, Y., DIOS, R. A Prospective Analysis of Immunohistochemically Determined Estrogen Receptor α and Progesterone Receptor Expression and Host and Tumor Factors as Predictors of Disease-free Period in Mammary Tumors of the Dog. *Veterinary Pathology*. 42:200-212, 2005.
40. MARTIN, P.M., COTARD, M., MIALOT, J.P. ANDRE, F., RAYNAUD, J.P. Animal models for hormone-dependent human breast cancer. Relationship between steroid receptor profiles in canine and feline mammary tumors and survival rate. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 12:13-17, 1984.

41. MARTINS, A.M.C.R.P.F., TAMASO, E., GERRA, J.L. Retrospective review and systematic study of mammary tumors in dogs and characteristics of the extracellular matrix. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 39:38-42, 2002.
42. MATOS, A.J.F., LOPES, C.C.C., FAUSTINO, A.M.R., CARVALHEIRA, J.G.V., RUTTEMAN, G.R., GÄRTNER, M.F.R.M. E-cadherin, β -catenin invasion and lymph node metastases in canine malignant mammary tumors. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*. 115: 327-334, 2007.
43. MERLO, D.F., ROSSI, L., PELLEGRINO, C., CEPPI, M., CARDELLINO, U., CAPURRO, C., RATTO, A., SAMBUCCO, P.L., SESTITO, V., TANARA, G., BOCCHINI, V. Cancer incidence in pet dogs: findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 22:976-984, 2008.
44. MILLANTA F. CALANDRELL, M., BARI, G., NICCOLINI, M., VANNOZZI, I., POLI, A. Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Research in Veterinary Science*. 79:225-232, 2005.
45. MILLANTA, F., CITI, S., DELLA SANTA, D., PORCIANI, M. E POLI, A. COX-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. *Breast Cancer Research and Treatment*. 98:115-120, 2006.
46. MISDORP, W., ELSE, R.W., HELLMÉN, E., LIPSCOMB, T.P. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat, Vol VII, 2nd series. Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington D.C., and World Health Organization Collaborating Center of Worldwide Reference on Comparative Oncology, 22-23, 1999.
47. MISDORP, W. & HART, A.M. Prognostic factors. In: Canine mammary cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 56: 779-786, 1976.
48. MOULTON, J.E., TAYLOR, N., DORN, C.R., ANDERSEN, A.C. Canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*. 7: 289-320, 1970.
49. MOULTON, J.E. Tumors of the mammary gland. In: Mammary Tumors in Domestic Animals. 3^a Ed. 518-522. University of California Press, Berkeley, CA, 1990.
50. MURUA ESCOBAR, H., BECKER, K. BULLERDIEK, J. NOLTE, I. The canine ERBB2 gene maps to a chromosome region frequently affected by aberrations in tumors of the dog (*Canis familiaris*). *Cytogenetic and Genome Research*. 94:194-195, 2001.

51. MULLIGAN, R.M. Mammary cancer in the dog: a study of 120 cases. *American Journal of Veterinary Research*. 36:1391-1396, 1975.
52. NIELSEN, T.O., HSU, F.D., JENSEN, K., CHEANG, M., KARACA, G., HU, Z, HERNANDEZ-BOUSSARD, T., LIVASY, C., COWAN, D., DRESSLER, L., AKSLEN, L.A., RAGAZ, J., GOWN, A.M., GILKS, C.B., VAN DE RIJN, M., PEROU, C.M. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 15:5367-5374, 2004.
53. NIETO, A., PENA, L., PÉREZ-ALENZA, M. D., SÁNCHEZ, M. A., FLORES, J. M., CASTAÑO, M. Immunohistologic Detection of Estrogen Receptor Alpha in Canine Mammary Tumors: Clinical and Pathologic Associations and Prognostic Significance. *Veterinary Pathology*. 37:239-247, 2000.
54. NERURKAR, V.R., SESHADRI, R., MULHERKAR, R., ISHWAD, C.S., LALITHA, V.S., NAIK, S.N. receptors for epidermal growth factor and estradiol in canine mammary tumors. *International Journal of Cancer*. 40:230-232, 1987.
55. NERURKAR V.R., CHITALE A.R., JALNAPURKAR B.V., NAIK S.N., LALITHA V.S. Comparative pathology of canine mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology*. 101:389-397, 1989.
56. NOLLET, F., BERX, G., VAN ROY, F. The role of E-cadherin/ catenin adhesion complex in the development and progression of cancer. *Molecular Cell Biology Research Communications*. 2:77-85, 1999.
57. OWEN, L. N. The TNM Classification of tumors in domestic animals, 1st Ed. World Health Organization, Geneva, 20-80, 1980.
58. PEÑA, L.L., NIETO, A.I., PÉREZ-ALENZA, D., CUESTA, P., CASTAÑO, M. Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 10:237-246, 1998.
59. PEREZ ALENZA, D., RUTTEMAN, G. R., PENA, L., BEYNEN, A. C., CUESTA, P. Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. *J Vet Intern Med*. 12:132-139, 1988.
60. PEROU C.M., SORLIE T., EISEN M.B., VAN DE RIJN M., JEFFREY S.S., REES C.A., POLLACK J.R., ROSS D.T., JOHNSEN H., AKSLEN L.A., FLUGE O., PERGAMENSHIKOV A., WILLIAMS C., ZHU S.X., LONNING P.E., BORRESEN-DALE A.L., BROWN P.O., BOTSTEIN D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 406:747-752, 2000.

61. PHILIBERT, J. C., SNYDER, P. W., GLICKMAN, N., GLICKMAN, L. T., KNAPP, D. W. E WATERS, D. J. Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors. *J Vet Intern Med.* 17:102-106, 2003.
62. PLAUT, K. Physiology and management. Role of Epidermal Growth Factor and Transforming Growth factors in mammary development and lactation. *Journal of Dairy Science.* 76:1526-1538, 1993.
63. QUEIROGA, F. L., PÉREZ-ALENZA, M. D., SILVAN, G., PEÑA, L., LOPES, C., ILLERA, J. C. Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 94:181-187, 2005.
64. RAKHA, E.A., PUTTI, T.C., ABD EL-REHIM, D.M., PAISH, C., GREEN, A.R., POWE, D.G., LEE, A.H., ROBERTSON, J.F., ELLIS, I.O. Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation. *The Journal of Pathology.* 208:495-506, 2006.
65. RAKHA EA, EL-SAYED ME, GREEN AR, LEE AH, ROBERTSON JF, ELLIS IO. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer.* 109(1):25-32, 2007.
66. RAKHA E.A., EL-SAYED M.E., REIS-FILHO J., ELLIS I.O. Patho-biological aspects of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment.* 113:411-422, 2009.
67. REIS-FILHO, J.S., MILANEZI, F., CARVALHO, S., SIMPSON, P.T., STEELE, D., SAVAGE, K., LAMBROS, M.B., PEREIRA, E.M., NESLAND, J.M., LAKHANI, S.R., SCHMITT, F.C. Metaplastic breast carcinomas exhibit EGFR, but not HER2, gene amplification and overexpression: immunohistochemical and chromogenic *in situ* hybridization analysis. *Breast Cancer Research.* 7:1028-1035, 2005.
68. REIS-FILHO, J.S., MILANEZI, F., STEELE, D., SAVAGE, K., SIMPSON, P.T., NESLAND, J.M., PEREIRA, E.M. Metaplastic carcinomas are basal-like tumors. *Histopathology.* 49:10-21, 2006.
69. RICHARDS, H.G., MCNEIL, P.E., THOMPSON, H., REID, S.W. An epidemiological analysis of a canine-biopsies database compiled by a diagnostic histopathology service. *Preventive Veterinary Medicine.* 51:125-136, 2001.
70. RUNGSIPIPAT, A., TATEYAMA, S., YAMAGUCHI, R., UCHIDA, K., MIYOSHI, N., HAYASHI, T. Immunohistochemical Analysis of c-yes and c-erbB-2 Oncogene Products and p53 Tumor Suppressor Protein in Canine Mammary Tumors. *The Journal of Veterinary Medical Science.* 6:27-32, 1999.

71. SASSI, F, BENAZZI, C, CASTELLANI, G. E SARLI, G. Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. *BMC Veterinary Research* 6:5, 2010.
72. SORENMO, K., SHOFR, F.S., GOLDSHIMIDT, M.H. Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 14:266-270, 2000.
73. SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. *The Veterinary Clinics of North America and Small Animal Practice*. May;33:573-596, 2003.
74. SORLIE, T., PEROU, C.M., TIBSHIRANI, R., AAS, T., GEISLER, S., JOHNSEN, H., HASTIE, T., EISEN, M.B., VAN DE RIJN, M., JEFFREY, S.S., THORSEN, T., QUIST, H., MATESE, J.C., BROWN, P.O., BOTSTEIN, D., EYSTEIN LONNING, P., BORRESEN-DALE, A.L. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98:10869-10874, 2001.
75. SORLIE, T., TIBSHIRANI, R., PARKER, J., TREVOR, H., MARRON, J.S., NOBEL, A. DENG, S., JOHNSEN, H., PESICH, R., GEISLER, S., DEMETER, J., PEROU, C.M., LONNING, P.E., BROWN, P.O., BORRESEN-DALE, A.L., ANNE-LISE, BOTSTEIN, D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100:8418–8423, 2003.
76. TAMIMI, R.M., BAER, H.J., MAROTTI, J., GALAN, M., GALABURDA, L., FU, Y., DEITZ, A.C., CONNOLLY, J.L., SCHNITT, S.J., COLDITZ, G.A., COLLINS, L.C. Comparison of molecular phenotypes of ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. *Breast Cancer Research*. 10:R67, 2008.
77. TSE, G.M., TAN P.H., PUTTI, T.C., LUI, P.C., CHAIWUN, B., LAW, B.K. Metaplastic carcinoma of the breast: a clinicopathological review. *Journal of Clinical Pathology*. 59:1079-1083, 2006.
78. TSUDA, H., TAKARABE, T., HASEGAWA, F., FUKUTOMI, T., HIROHASHI, S. Large, central acellular zones indicating myoepithelial tumor differentiation in high-grade invasive ductal carcinomas as markers of predisposition to lung and brain metastases. *American Journal of Surgical Pathology*. 24:197-202, 2000.
79. VELDHOFEN, N., WATTERSON, J., M BRASH E MILNER, J. Identification of tumour-associated and germ line p53 mutations in canine mammary cancer. *British Journal of Cancer* 81:409-415, 1999.

80. WARGOTZ, E.S. & NORRIS, H.J. Metaplastic carcinomas of the breast. I. Matrix-producing carcinoma. *Human Pathology*. 20:628-635, 1989.
81. WARGOTZ E.S., DEOS P.H., NORRIS H.J. Metaplastic carcinomas of the breast. II. Spindle cell carcinoma. *Human Pathology*. 20:732-740, 1989.
82. WARGOTZ, E.S. & NORRIS, H.J. Metaplastic carcinomas of the breast. III. Carcinosarcoma. *Cancer*. 64:1490-1499, 1989.
83. WARGOTZ, E.S. & NORRIS, H.J. Metaplastic carcinomas of the breast. IV. Squamous cell carcinoma of ductal origin. *Cancer*. 65:272-276, 1990.
84. WARGOTZ, E.S. & NORRIS, H.J. Metaplastic carcinomas of the breast. V. Metaplastic carcinoma with osteoclastic giant cells. *Human Pathology*. 21:1142-1150, 1990.
85. WOLFF, A.C., HAMMOND, M.E., SCHWARTZ, J.N., HAGERTY, K.L., ALLRED, D.C., COTE, R.J., DOWSETT, M., FITZGIBBONS, P.L., HANNA, W.M., LANGER, A., MCSHANE, L.M., PAIK, S., PEGRAM, M.D., PEREZ, E.A., PRESS, M.F., RHODES, A., STURGEON, C., TAUBE, S.E., TUBBS, R., VANCE, G.H., VAN DE VIJVER, M., WHEELER, T.M., HAYES, D.F. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 25:118-45, 2007.

ANEXOS

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal - CETEA



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -**

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 123/2009**, relativo ao projeto intitulado "***Estudo sobre o Carcinoma em tumor misto da mama da cadela: avaliação de aspectos morfológicos e do seu perfil imunofenotípico***", que tem como responsável(is) **Geovanni Dantas Cassali**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **26/ 08/2009**.

Este certificado expira-se em **26/ 08/ 2014**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 123/2009**, related to the project entitled "***Study of carcinoma in mixed tumor of the breast of the bitch: morphological and immunophenotypic profiles***", under the supervisors of **Geovanni Dantas Cassali**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **August 26, 2009**.

This certificate expires in **August 26, 2014**.

Belo Horizonte, 27 de Agosto de 2009.

**Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG**

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@proq.ufmg.br

ANEXO B - Artigo científico produzido a partir da presente dissertação e submetido ao
peródico Veterinary Pathology

**Morphological aspects and immunophenotypic profiles from mammary
carcinomas in benign mixed tumor of female dogs**

Gustavo Meirelles Ribeiro 1, MD; Angélica Cavalheiro Bertagnolli 2, MD, PhD; Rafael
Malagoli Rocha 3, MD, PhD; Geovanni Dantas Cassali 4, MD, PhD.

*1Laboratory of Comparative Pathology- Department of General Pathology – ICB-UFMG, Belo
Horizonte, Minas Gerais, Brazil*

*2 Department of Medical Sciences, Federal University of Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais,
Brazil.*

*3 Faculty of Health Sciences, University of Vale do Rio Doce, Governador Valadares, Minas
Gerais, Brazil.*

*4Laboratory of Investigative Pathology, Department of Anatomic Pathology, Hospital A.C
Camargo, São Paulo, SP, Brazil.*

Corresponding author: Geovanni Dantas Cassali, Laboratory of Comparative Pathology- Department of General Pathology – ICB-UFMG; Cx postal 486, CEP: 31270-901. Tel : 0055 31 3409 2891; Fax: 0055 31 34092879. Email: **cassalig@icb.ufmg.br**

Abstract: Carcinoma in benign mixed tumor of canine mammary gland is frequent and is composed by malignant epithelial elements and benign mesenchymal elements.

This study aims to describe the morphological aspects and analyze the immunophenotypical profiles of carcinomas in benign mixed tumors and compare it to findings in human metaplastic carcinomas.

Descriptive analysis of 29 cases of carcinomas in benign mixed tumors from female dogs of several breeds was performed to investigate histological type, necrosis, vascular invasion, histological grade and mitosis of *in situ* and invasive elements of carcinomatous component.

We have estimated the frequency mesenchymal elements (cartilage, bone and bone marrow) for mesenchymal component evaluation.

The immunohistochemical panel was composed by estrogen/ progesterone receptors, human epidermic growth factor receptor 2 (HER2), cytokeratin 5 and epidermic growth factor type I receptor (EGFR), and was applied to verify the molecular-based classification.

Carcinomatous components showed similar morphological features to the metaplastic carcinoma of human breast. Histological grade I was observed in 16/29 (55.2%) of the analyzed tumors; grade II in 10/29 (34.5%); and grade III in 3/ 29 (1.5%) of the tumors.

Immunophenotypically, invasive carcinomatous component has shown, more frequently, luminal A in 12/ 29 (41.4%), followed by basal-like phenotype in 8 /29 (27.6%). In conclusion, carcinoma component in mixed tumor of female dogs shows very similar tissue components to metaplastic carcinoma of human breast, but discordant features concerning histological grade and immunophenotypical profile.

Keywords: mammary gland, tumor, canine, mixed tumor.

Introduction

Mammary glands are the most frequent site of neoplasias in female dogs (5). Besides the fact that this has been one of the most frequent death cause of these animals, this neoplasias show similarities when compared with the human breast neoplasias (3, 10, 11, 14, 17, 20, 22, 28).

Thus, knowledge of its etiopathogeny and biological features is of great interest.

Mixed tumors are histologically characterized by a mixture of epithelial components (ductal and/or acinous cells and myoepithelial cells) within an apparently mesenchymal stroma, capable of producing different degrees of myxoid, chondroid, and bone tissues. These neoplasias can be benign mixed tumors or can undergo malignant transformation and give rise to carcinomas in benign mixed tumors (21).

In a comparative evaluation, metaplastic carcinomas of human breast have histological features comparable to carcinoma in benign mixed tumor of canine mammary gland (9).

The metaplastic carcinoma is part of a heterogeneous group of tumors, corresponding to 1% of all invasive carcinomas of human breast (26). This expression is used to identify malignant neoplasias with malignant epithelial components between mesenchymal components, or primitive squamous carcinomas of ductal elements, or else

adenocarcinomas with squamous metaplasia (33). Human metaplastic carcinoma usually shows poor prognostic, with very frequently distant metastases even when regional lymph nodes aren't affected (15).

Five subtypes of metaplastic carcinomas were described: matrix-producing carcinoma (35); spindle cells carcinoma (34); carcinosarcoma (36); squamous cell carcinoma of ductal origin (37) and metaplastic carcinoma with osteoclastic giant cells (38).

Recently, at least five distinct molecular subtypes of human breast carcinomas have been identified based on gene expression profiling, which differ in their pathology and clinical outcomes: luminal A, luminal B, HER2, basal-like and normal breast tissue like (31).

Some authors stated that metaplastic carcinomas showed the typical immunohistochemical profile of basal-like breast carcinomas in 91% of cases (27). The phenotypical profile was defined by absence of estrogen receptor (ER) and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) and positive cytokeratin 5/6 (CK5/6) and/or epidermal growth factor receptor (EGFR).

The basal-like carcinomas of human breast, as defined by these authors, show a more aggressive clinical behavior. These lesions usually express basal keratins such as cytokeratin 5/6 and cytokeratin 17, EGFR (HER1/c-erbB1) and c-KIT (CD117) and are typically negative for estrogen receptors and for HER2 (23). They correspond to 2-18% of all breast carcinomas and can show several histological types, like ductal (SOE), medullar, adenoid cystic and metaplastic carcinomas (25).

In spite of histological similarities between carcinomas in benign mixed tumors and human metaplastic carcinomas, clinical and pathobiological similarities between lesions of these two species need be confirmed to make comparisons feasible.

Studies with regard to the relationship between prognostic factors and carcinomas in benign mixed tumors have been described (1,6,9,12,16,29), yet relatively little is known about the prognosis and biological behavior of these neoplasms.

The molecular-based classification, adopted for breast cancer, seems to be a valuable tool for assess the prognosis and to establish similarities between the two models. However studies that analyze molecular features of mammary tumors of female dogs are rare in literature and show basically data on several histological types of mammary carcinomas (8,30).

In the present study, we have comprehensively analyzed morphological and immunophenotypical features of carcinoma components in mixed tumor of female dogs and compared them with morphological features described for metaplastic carcinomas of human breast.

In addition the association between immunophenotypes and morphological features was performed.

Material and Methods

Subject

Twenty-nine (n=29) tissue samples of carcinoma in mixed tumor were obtained from female dogs (several breeds) underwent surgery at the Veterinary School Hospital of Universidade Federal de Minas Gerais (EV/UFMG), Belo Horizonte, Brazil. The procedures performed in this study were submitted and approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation of this institution (CETEA/UFMG) under protocol # 123/2009.

The morphological criteria used for the diagnosis of the lesions were proposed by Misdorp et al. (19). As inclusion criteria, the integrity of paraffin blocks from each case with prior diagnosis of carcinoma in mixed tumor was employed. As exclusion criteria, damage in paraffin blocks, diagnostic doubts, other diagnoses, and samples with fixation and processing artifacts were considered.

All samples had already been submitted to histological processing by routine techniques and were included in paraffin blocks. Six consecutive histological sections 4µm thick were obtained from one block of each case, chosen previously as representative of the lesion. Hematoxylin and eosin staining (H&E) was performed in the first section to proceed with the neoplasia classification according to Misdorp et al. (19), the other sections were used for the immunohistochemistry study.

In the malignant epithelial component, the following parameters were observed: histological grade (7), mitotic index (Table 1), presence of necrosis, presence of an *in situ* (malignant non invasive) proliferation and the presence of stromal and vascular invasion. The presence of neoplastic emboli within spaces covered by endothelium was established in order to determine vascular invasion.

The malignant epithelial component *in situ* was classified according to the Consensus Conference on the classification of ductal carcinoma *in situ* (4). The lesions were graduated second Lagios (13), in high, intermediate and low degrees.

In stromal components, the following parameters were evaluated: presence of chondroid and mixoid matrix, presence of stromal elements (chondroid and mixoid matrix, cartilage, bone tissue and bone marrow), and investigation of morphological features of malignancy.

All cases were examined by two pathologists and discordant results were discussed with a third pathologist, for consensus.

Immunohistochemistry

Consecutive 4µm thick sections were obtained and mounted on silanized slides. Tissue sections were deparaffinized and rehydrated in graded ethanol. The ER, PR receptors and CK5 antigens were retrieved with citrate buffer (pH 6.0) and heating 4 minutes in Pascal pressure chamber (DAKO). After that, the slides were immersed in hydrogen peroxide 3%, for 30 minutes (3 baths/ 10 minutes each) for endogen peroxidase blocking. The histological sections were incubated in a humid chamber for 18 hours with primary antibody. Antigens were immunodetected using Novolink® System Max Polymer (Leica) for 30 minutes at 37 °C.

The HER2 and EGFR antigens were retrieved in water bathing, with the Solution Retrieval® (DAKO), at pH 6.0 for 20 minutes, to 98 °C. Endogenous peroxidase was blocked by immersion in 3% hydrogen peroxide for 15 min. Samples were incubated in a humid chamber for 14 hours (overnight) with primary antibody, followed by amplification with Advance HRP® link (DAKO).

In all slides 3,3'-diaminobenzidine (DAB) was used as cromogen. Sections were counterstained with Mayer's hematoxilin, dehydrated, and mounted in a synthetic medium. Table 2 shows the characteristics of the primary antibodies.

Canine mammary tumor samples known to express all markers were used as positive controls. Negative controls were obtained by primary antibody omission.

For ER and PR markers, positivity was considered when more than 10% of cell nucleus showed signal (18). HER2 marker follows the pattern established by American Society of Clinical Oncology/ American College of Pathology (39). Cases were considered positives for EGFR when 10% of membrane cell were stained (25). For CK5 marker positive cases were considered with low or high cytoplasm staining of tumor cells (8).

Molecular profiles of analyzed samples were defined as: Luminal A (ER+ and/or PR+, HER2-, any EGFR and CK5); Luminal B (ER+ and/or PR+, HER2+, any EGFR and CK5); HER2-like (ER- and PR-, HER2+, any EGFR and CK5); Basal-like (ER- and /or PR-, HER2-, EGFR and/or CK5+); Normal like (negative for all markers) (2).

Statistical analysis

A descriptive analysis of absolute and relative frequencies of morphological and phenotypical features and molecular profile of sample cases was performed.

Fisher's exact probability test ($P < 0.05$) was used to test possible associations of the studied features. Analysis of concordance between molecular profile of *in situ* component and invasive component was done by Kappa statistic index and Kappa significance test. Conventional level of significance 5% was used to define statistical significance ($p < 0.05$). Analyses were performed by STATA 9.0 software (StataCorp LP).

Results

Morphology

Carcinomas in benign mixed tumors of canine mammary gland were defined as carcinomatous cells occurring in a benign mixed tumor (19).

In particular the diagnosis of carcinoma was based on presence of focus of atypical epithelial cells, which often show infiltrative growth characterized by presence of clusters of tumour cells penetrating the stroma. The presence of an *in situ* (malignant non invasive) was evaluated.

In situ malignant epithelial component was identified in 15/ 29 samples (15.7%). Most of those were of solid histological type 9/ 15(60%) followed by solid/ cribriform in 3/ 15 samples (20%), micropapillary in 2/ 15 samples (13.3%) and papillary/ micropapillary

in one sample (6.7%). The most frequent histological grades were II and I - 11/15 (73.3%) and 3/ 15 (20%), respectively.

All the samples studied showed diagnosis of carcinoma in benign mixed tumor and morphological characteristics similar that of metaplastic matrix-producing carcinoma, such as carcinoma with transition to stromal matrix without an intervening spindle cell zone or osteoclastic giant cells.

The majority of lesions demonstrated low histological grade (16/ 29 samples, 55.2%) and low mitotic index (21/ 29 samples, 72.4%) as showed in tables 3 and 4, respectively.

Focal and discrete necrosis was observed in 7 cases (24.1%). None of cases showed vascular invasion and squamous metaplasia was noted in 1 case (3.4%).

No malignant transformation was observed in stromal component of any lesions. Mixoid matrix was found in 10 cases (34.5%) and mixoid/chondroid matrix in 19 cases (65.5%). In the stromal component, only mesenquimal matrix (mixoyd or mixoid chondroid) was observed in 19 (65.6%) samples, matrix and cartilage in 4 (13.8%) samples, matrix, cartilage and bone in 3 (10,3%) samples and matrix, cartilage and bone with bone marrow in 3 (10,3%) samples (Table 5).

Neither significant statistical association was noted between profiles identified in epithelial component and stromal pattern (mixoid and mixoid/chondroid) ($p=0.773$), nor between profiles of epithelial component and stromal elements ($p=0.48$).

Immunohistochemical profile

Among the *in situ* malignant epithelial components, Luminal A profile accounted for 9/ 15 (60%) of tumors followed by HER2-like profile in 3/ 15 samples (20%), Luminal

B profile in 2 (13.3%) samples and Basal profile in one (6.7%) sample, according to the criteria adopted for molecular profile.

In invasive carcinomas, Luminal A profile was also predominant in 12/29 samples (41.4%), followed by Basal-like profile in 8/ 29 samples (27.6%), HER 2 profile in 5 (17.2%) samples and Luminal B profile in 4 (13.8%) samples (Table 6).

Still in invasive component, myoepithelial cell markers were positive in 27 cases observed (CK5 and/or EGFR). In 15 cases (51.7% of all cases) both markers were positive, and 10 cases (34% of all cases) were CK5 positive only, and 2 cases (6.9% of all cases) were EGFR positive only.

No significant statistic correlation were noted between immunophenotypical profiles of invasive malignant epithelial component in mixed tumor and histological grade ($p=0.735$) or mitotic index ($p=0.076$).

Invasive carcinoma cases in which *in situ* component was identified ($n=14$) showed the following immunophenotypical profiles percentage: Luminal A (50%), Basal-like (35.8%), Luminal B (7.1%) and HER2-like (7.1%).

High concordance between immunophenotypical profiles of *in situ* malignant epithelial component and invasive malignant epithelial component was observed by Kappa coefficient evaluation (Kappa coefficient = 0.816, $p < 0.001$) (Table 7).

Discussion

Morphological analysis of 29 cases of carcinoma in mixed tumor of female dogs showed epithelial and mesenchymal elements similar to those described in matrix-producing metaplastic carcinoma of human breast. All studied cases showed presence of mixoid matrix or chondroid-mixoid matrix which is a classical figure in diagnosis, as described for this subtype of metaplastic carcinoma in humans (35). In only one case

squamous metaplasia in carcinomatous component was observed and in none malignant alterations in stromal component were observed.

Invasive malignant epithelial component showed predominance of histological grade I (55.2%). That finding is not in agreement with in matrix-producing metaplastic carcinoma in humans described by Wargotz and Norris (35), where it was observed prevalence of carcinomas of grade II and grade III. These findings are of relevance, since the histologic grade is an important prognostic factor on survival, carcinomas in benign mixed tumors seems to have better prognosis then matrix-producing metaplastic carcinoma in humans.

Therefore, the predominance of carcinomas with low histological grade indicates that these tumors had morphological characteristics related to better prognosis when compared with metaplastic carcinomas.

Karayannopoulou et al. (12) showed similar frequencies of histological grades of carcinoma in mixed tumor when compared with this study. Similar findings also had been shown by Dutra et al. (6), where histological grade I were present in 75% of cases with 80% survival during the period of five years.

Other morphological findings can suggest the minor aggressive characteristics of carcinoma in mixed tumor, like no vascular invasion and few necrosis (focal and discrete in 24.1% of cases).

The immunohistochemical analyses demonstrated the heterogeneity of tumor profiles with prevalence of Luminal A type (41.1%), followed by Basal-like type (27.6%). Reis-Filho et al. (27) showed that human metaplastic carcinomas demonstrated immunohistochemical profile basal-like in 91% of cases.

Luminal A profile in humans was described as a subtype related to a low histological grade and excellent prognosis (31). These findings demonstrated that

carcinoma in mixed tumor of female dogs exhibits immunophenotypical features different from carcinoma metaplastic in humans and probably more studies are necessary to use as an adequate model in comparative pathology.

The HER2 immunophenotype of invasive malignant epithelial component of our study (17.2%) disagree with the findings of Reis-Filho et al. (26) in carcinoma metaplastic in human breast, where overexpression of HER2 protein was noted only in one case (4%). Otherwise, percentages of immunophenotypical profiles predominant in malignant epithelial component in our study (Luminal A – 41.4%; Basal-like – 27.6%) are similar to those found in immunophenotypical study of mammary tumors of female dogs (Luminal A 44.8%; Basal-like – 29.2%) (8).

In another study of immunophenotypical profile of mammary carcinoma in female dogs (30), authors analyzed, among other histological types, 25 cases between complex carcinomas and carcinomas in mixed tumor and the immunophenotypical profile more frequent was Luminal B (48%), followed by Basal-like (28%). These data suggest that carcinomas in mixed tumor of female dogs are a heterogeneous group of tumors with variable immunophenotypes. In this study, the authors used a different panel for immunohistochemical analysis, when compared with that applied in the present study, that could explain some differences in the results.

Sassi et al. (30) found correlations between the immunophenotypical profile and histological grade in mammary carcinomas of female dogs, data not found in our work.

A possible explanation for the different results is that the series of cases studied by Sassi et al. (30) included several types of carcinomas.

Immunophenotypical profile more frequent was Luminal A (60%) followed by HER2 (20%). Predominance of Luminal A profile is consistent with studies of carcinoma *in situ* in humans, where this subtype is more frequent when the correspondent invasive

epithelial component shows low histological grade (32). Possible explanation for HER2 profile follow the first could be the overexpression of HER2 protein and amplification of HER2 gene in carcinomas *in situ* of human breast (32). The importance of these findings is try to understand the progression from carcinoma *in situ* to invasive carcinoma in the studied lesions.

Even with these differences, there was a high agreement between molecular profiles of *in situ* and invasive epithelial components of carcinoma in mixed tumor of dogs.

At least one myoepithelial cell marker (CK5 and/or EGFR) shows positivity in 27 cases (93.1%). This could suggest that the origin of carcinoma mixed is myoepithelial cells (30). Gama et al. (8) also showed high positivity for EGFR in carcinomas in mixed tumors (71.4%).

Studies with immunohistochemical panels to molecular profile definitions in mammary carcinoma in female dogs are rare e very conflicting when compared between them and when compared with clinical-pathological features of human correspondent. Some data that disagree with findings in human breast pathology, like better survival rates of subjects with carcinomas HER2 profile (8) or lack of correlation between molecular profile and histological type (30) suggests that more complex studies with higher sample number and evaluating same types of carcinomas with clinical approach could be usefull to adequated treatment choice and to define experimental models for research in compared pathology as well.

In summary, our results demonstrate that carcinomas in benign mixed tumors show morphological features which has been associated with a better prognosis in canine mammary neoplasias and were predominantly, luminal A phenotype.

The stromal components are very similar to metaplastic carcinoma of human breast, but there are discordant features in relation of morphological features and

immunophenotypical profile. These data suggest that additional studies are needed on clinical and pathological characteristics of canine mammary tumors in order to use it as a model for comparative pathology.

Declaration of Conflict of Interest

The authors declared that they had no conflicts of interests with respect to their authorship or the publication of this article.

Financial Disclosure/ Funding

This study was supported by CNPq, FAPEMIG, FAPESP e CAPES.

References

1. Bertagnolli AC, Cassali GD, Genelhu MCLS, Costa FA, Oliveira JFC, Gonçalves PBD. Immunohistochemical Expression of p63 and Δ Np63 in Mixed Tumors of Canine Mammary Glands and Its Relation with p53 Expression. **Vet Pathol** 46:407-415, 2009.
2. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, Karaca G, Troester MA, Tse CK, Edmiston S, Deming SL, Geradts J, Cheang MCU, Nielsen TO, Moorman PG, Earp SE, Millikan RC. Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina Breast Cancer Study. **JAMA** 295:2492-2502, 2006.
3. Cassali GD. Aspectos morfológicos, imunohistoquímicos e citométricos de tumores mamários da cadela - aspectos comparativos com neoplasias da mama humana, 73p. (Doctoral dissertation in Animal Science) – Curso de Pós Graduação em Patologia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2000.

4. **Consensus** conference on the classification of ductal carcinoma *in situ*. **Hum Pathol** 28:1221-1225, 1997.
5. Dobson JM, Samuel S, Milstein H, Rogers K, Wood JL. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. **JSAP** 43:240-246, 2002.
6. Dutra AP, Azevedo Junior GM, Schmitt FC, Cassali GD. Assessment of cell proliferation and prognostic factors in canine mammary gland tumors. **Arq Bras Med Vet Zootec** 60, 1403-1412, 2008.
7. Elston CW & Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology** 19:403-410, 1991.
8. Gama A, Alves A, Schmitt F. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. **Virchows Archiv** 453:123-132, 2008.
9. Genelhu MCLS, Cardoso SV, Gobbi H, Cassali GD. A comparative study between mixed-type tumours from human salivary and canine mammary glands. **BMC Cancer** 7:218, 2007.

10. Geraldès M, Gärtner F, Schmitt F. Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumors. **Vet Rec** 146:403-436, 2000.
11. Hellmén E, Bergström R, Holmberg L, Spångberg IB, Hansson K, Lindgren A. Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. **Vet Pathol** 30:20-27, 1993.
12. Karayannopoulou M, Kaldrymidou E, Constantinidis T.C, Dessiris A. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. **J Comp Pathol** 133:246-252, 2005.
13. Lagios MD. Duct Carcinoma in situ. Pathology and Treatment. **Surg Clin North Am** 70: 853-871, 1990.
14. Lee CH, Kim W, Lim JH, Kang MS, Kim DY, Kweon OK. Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. **J Vet Sci** 5:63-69, 2004.
15. Luini A, Aguilar M, Gatti G, Fasani R, Botteri E, Brito JA, Maisonneuve P, Vento AR, Viale G. Metaplastic carcinoma of the breast, an unusual disease with worse prognosis: the experience of the European Institute of Oncology and review of the literature. **Breast Cancer Res Treat** 101:349-353. 2007.

16. Martín de las Mulas J, Millán Y, Dios R. A Prospective Analysis of Immunohistochemically Determined Estrogen Receptor α and Progesterone Receptor Expression and Host and Tumor Factors as Predictors of Disease-free Period in Mammary Tumors of the Dog. **Vet Pathol** 42:200-212, 2005.

17. Merlo DF, Rossi L, Pellegrino C, Ceppi M, Cardellino U, Capurro C, Ratto A, Sambucco PL, Sestito V, Tanara G, Bocchini V. Cancer incidence in pet dogs: findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. **J Vet Intern Med** 22:976-984, 2008.

18. Millanta F, Calandrell M, Bari G, Niccolini M, Vannozzi I, Poli A. Comparision of steroid receptor expression in normal, dysplatic and neoplastic canine and feline mammary tissues. **Res Vet Sci** 79:225-232, 2005.

19. Misdorp W, Else RW, Hellmén E, Lipscomb TP. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat, Vol VII, 2nd series. Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington D.C., and World Health Organization Collaborating Center of Worldwide Reference on Comparative Oncology, 22-23, 1999.

20. Misdorp W. and Hart AM. Prognostic factors. In: Canine mammary cancer. **J Natl Cancer Inst** 56: 779-786, 1976.

21. Moulton JE, Taylor N, Dorn CR, Andersen AC. Canine mammary tumors. **Vet Pathol** 7: 289-320, 1970.

22. Mulligan RM. Mammary cancer in the dog: a study of 120 cases. **Am J Vet Res** 36:1391-1396, 1975.
23. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, Hernandez-Boussard T, Livasy C, Cowan D, Dressler L, Akslen LA, Ragaz J, Gown AM, Gilks CB, Van De Rijn M, Perou CM. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **Clin Cancer Res** 15:5367-5374, 2004.
24. Rakha EA, Putti TC, Abd El-Rehim DM, Paish C, Green AR, Powe DG, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO. Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation. **J Pathol** 208:495-506, 2006.
25. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. **Cancer** 109(1):25-32, 2007.
26. Reis-Filho JS, Milanezi F, Carvalho S, Simpson PT, Steele D, Savage K, Lambros MB, Pereira EM, Nesland JM, Lakhani SR, Schmitt FC. Metaplastic breast carcinomas exhibit EGFR, but not HER2, gene amplification and overexpression: immunohistochemical and chromogenic *in situ* hybridization analysis. **Breast Cancer Res** 7:1028-1035, 2005.

27. Reis-Filho JS, Milanezi F, Steele D, Savage K, Simpson PT, Nesland JM, Pereira EM. Metaplastic carcinomas are basal-like tumors. **Histopathology** 49:10-21, 2006.
28. Richards HG, Mcneil PE, Thompson H, Reid SW. An epidemiological analysis of a canine-biopsies database compiled by a diagnostic histopathology service. **Prev Vet Med** 51:125-136, 2001.
29. Rungsipat A, Tateyama S, Yamaguchi R, Uchida K, Miyoshi N, Hayashi T. Immunohistochemical analysis of c-yes and c-erbB-2 Oncogene Products and p53 Tumor Suppressor Protein in Canine Mammary Tumors. **J Vet Med Sci** 6:27-32, 1999.
30. Sassi F, Benazzi C, Castellani GE, Sarli G. Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. **BMC Vet Res** 6:5, 2010.
31. Sorlie T, Perou CM, Tibshiranie R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lonning PE, Borresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci USA** 98:10869-10874, 2001.
32. Tamimi RM, Baer HJ, Marotti J, Galan M, Galaburda L, Fu Y, Deitz AC, Connolly JL, Schnitt SJ, Colditz GA, Collins LC. Comparison of molecular phenotypes of

- ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. **Breast Cancer Res** 10:R67, 2008.
33. Tse GM, Tan PH, Putti TC, Lui PC, Chaiwun B, Law BK. Metaplastic carcinoma of the breast: a clinicopathological review. **J Clin Pathol** 59:1079-1083, 2006.
 34. Wargotz ES, Deos PH, Norris HJ. Metaplastic carcinomas of the breast. II. Spindle cell carcinoma. **Hum Pathol** 20:732-740, 1989.
 35. Wargotz ES and Norris HJ. Metaplastic carcinomas of the breast. I. Matrix-producing carcinoma. **Hum Pathol** 20:628-635, 1989.
 36. Wargotz ES and Norris HJ. Metaplastic carcinomas of the breast. III. Carcinosarcoma. **Cancer** 64:1490-1499, 1989.
 37. Wargotz ES and Norris HJ. Metaplastic carcinomas of the breast. IV. Squamous cell carcinoma of ductal origin. **Cancer** 65:272-276, 1990.
 38. Wargotz ES and Norris HJ. Metaplastic carcinomas of the breast. V. Metaplastic carcinoma with osteoclastic giant cells. **Hum Pathol** 21:1142-1150, 1990.
 39. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, Mcshane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, Van De Vijver M, Wheeler TM, Hayes DF. American Society of Clinical

Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. **Arch Pathol Lab Med** 25:118-45, 2007.

Table 1: Correlation between mitosis number and mitotic index in carcinomas

Number of mitosis/10 fields, magnification 40X (*)	Score	Classification
0 a 7	1	Low
8 a 16	2	Moderate
> 17	3	High

* *Field Diameter: 0.55 mm; Field Area: 0.26 mm². Dutra et al., 2008.*

Table 2: Immunohistochemical panel of antibodies.

Antibody	Manufacturer	Clone	Concentration	Signal
ER	Dako	1D5	1:100	Nucleus
PR	Novocastra	IA6	1:20	Nucleus
HER2	Dako	A0485	1:180	Membrane
EGFR	Zymed	31G7	1:100	Membrane/ Cytoplasmic
CK 5	Novocastra	XM26	1:300	Cytoplasmic

Table 3: Histological grade of invasive epithelial component (n=29)

Grade	Frequency	%
I	16	55.2
II	10	34.5
III	3	10.3
Total	29	100

Table 4: Mitotic Index of invasive epithelial component (n=29)

Mitotic Index	Frequency	%
Low	21	72.4
Moderate	6	20.7
High	2	6.9
Total	29	100

Table 5: Frequency of the tissue types observed in stromal component of carcinoma in mixed tumor.n=29)

Mesenquimal Component	Frequency	%
Matrix	19	65.6
Matrix and cartilage	4	13.8
Matrix, cartilage and bone	3	10.3
Matrix, cartilage, bone with bone marrow	3	10.3
TOTAL	29	100

Table 6: Immunophenotypical profile distribution of invasive component (n=29)

Immunophenotypical profile	Frequency	%
Luminal A	12	41.4
Basal	8	27.6
HER2	5	17.2
Luminal B	4	13.8
TOTAL	29	100

Table 7: Concordance between Immunophenotypical profiles of *In Situ* malignant epithelial component and invasive malignant epithelial component (n=15)

Profile (<i>in situ</i>)	Profile (invasive)				Kappa Coefficient (P-value)
	Luminal A	Luminal B	HER2	Basal	
Luminal A	5	0	0	1	0.816 (<0.001)
Luminal B	0	2	0	0	
HER2	0	1	4	0	
Basal	0	0	0	2	

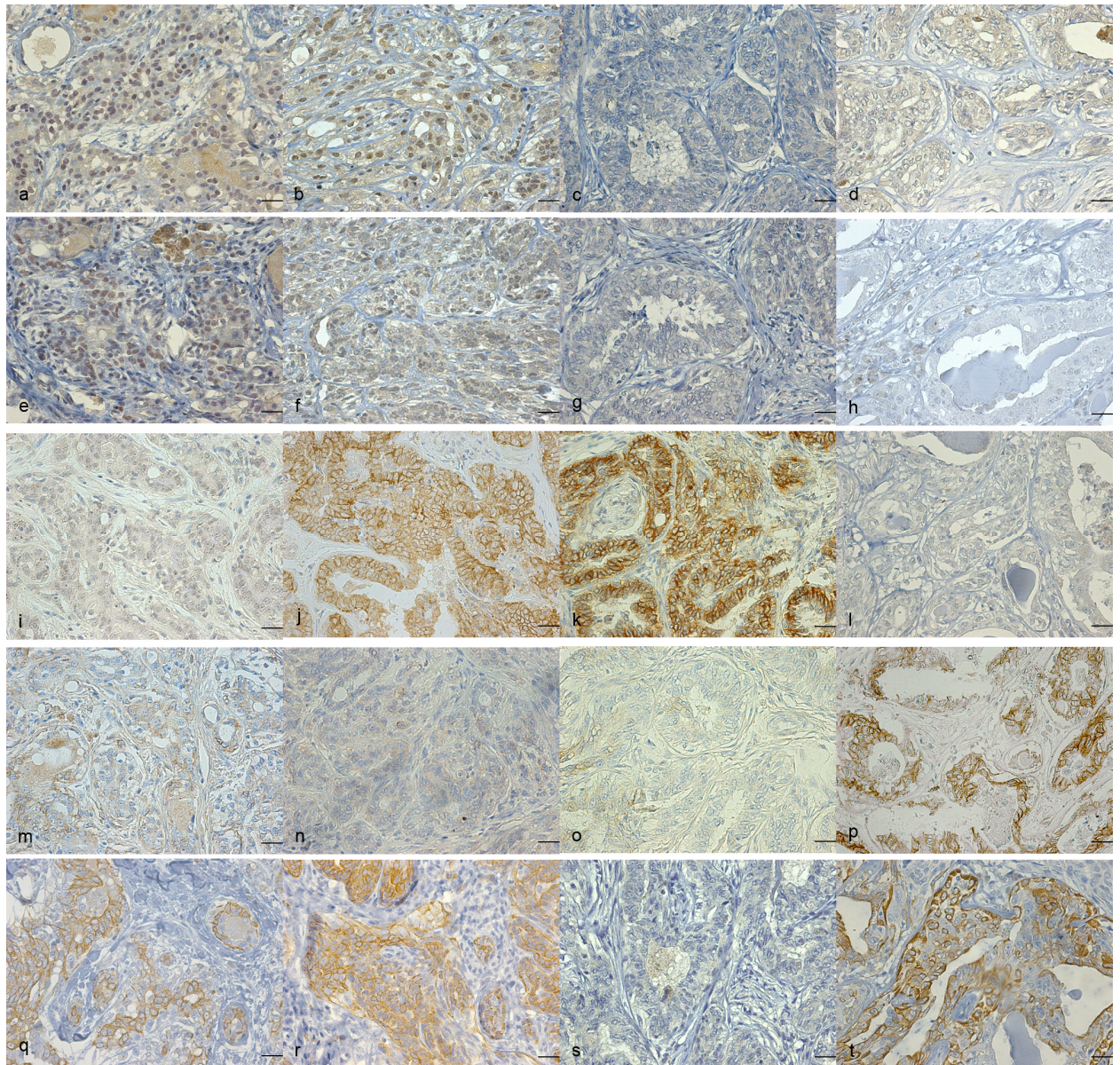


Figure 1: Immunohistochemical expression of the different proteins in carcinoma in mixed tumor.

a - d: ER staining; **e - h:** PR staining; **i - l:** HER2 staining; **m - p:** EGFR staining; **q - t:** CK5 staining. Each column represents a distinct molecular subtype. From left to right: Luminal A (case 13), Luminal B (case 21), HER2 (case 20) and basal-like (case 17) . Bar: 25 μ m.