

FERNANDA CAMARGO NUNES

**IDENTIFICAÇÃO DE FENÓTIPOS MOLECULARES E SUA RELAÇÃO
COM FATORES CLÍNICO-PATOLÓGICOS, TRATAMENTO E
SOBREVIDA EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS**

**Universidade Federal de Minas Gerais
Programa de Pós-graduação em Patologia
Belo Horizonte – MG**

2019

FERNANDA CAMARGO NUNES

**IDENTIFICAÇÃO DE FENÓTIPOS MOLECULARES E SUA RELAÇÃO COM
FATORES CLÍNICO-PATOLÓGICOS, TRATAMENTO E SOBREVIVÊNCIA EM
NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS**

Belo Horizonte – MG

Mai de 2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG
FACULDADE DE MEDICINA

TESE DE DOUTORADO

**IDENTIFICAÇÃO DE FENÓTIPOS MOLECULARES E SUA RELAÇÃO COM
FATORES CLÍNICO-PATOLÓGICOS, TRATAMENTO E SOBREVIDA EM
NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS**

Belo Horizonte - MG

2019

FERNANDA CAMARGO NUNES

**IDENTIFICAÇÃO DE FENÓTIPOS MOLECULARES E SUA RELAÇÃO COM
FATORES CLÍNICO-PATOLÓGICOS, TRATAMENTO E SOBREVIDA EM
NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS**

Tese 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 Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali

Co-Orientadoras: Gleidice Eunice Lavalle

Angélica Cavalheiro Bertagnolli

Belo Horizonte
Faculdade de Medicina - UFMG
2019

Nunes, Fernanda Camargo.

N972i Identificação de fenótipos moleculares e sua relação com fatores clínico-patológicos, tratamento e sobrevida em neoplasias mamárias caninas [manuscrito]. / Fernanda Camargo Nunes. - - Belo Horizonte: 2019.

124f.: il.

Orientador (a): Geovanni Dantas Cassali.

Coorientador (a): Gleidice Eunice Lavallo; Angélica Cavaleiro Bertagnolli.

Área de concentração: Patologia.

Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697

ATA DA DEFESA DE TESE DO ALUNO

FERNANDA CAMARGO NUNES

Realizou-se, no dia 02 de maio de 2019, às 14:00 horas, CAD, sala 301, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada *IDENTIFICAÇÃO DE FENÓTIPOS MOLECULARES E SUA RELAÇÃO COM FATORES CLÍNICO-PATOLÓGICOS, TRATAMENTO E SOBREVIVÊNCIA EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS*, apresentada por FERNANDA CAMARGO NUNES, número de registro 2015707080, graduada no curso de MEDICINA VETERINÁRIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Geovanni Dantas Cassali - Orientador (UFMG), Prof(a). Gleidice Eunice Lavalle (UFMG), Prof(a). Alessandra Estrela-Lima (UFBA), Prof(a). Débora Balabram (UFMG), Prof(a). Karine Araújo Damasceno (Fiocruz -BA), Prof(a). Paulo Cesar Jark (Universidade Brasil).

A Comissão considerou a tese:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 02 de Maio de 2019.

Prof. Geovanni Dantas Cassali (Doutor)

Prof.^a Gleidice Eunice Lavalle (Doutora)

Prof.^a Alessandra Estrela-Lima (Doutora)

Prof.^a Débora Balabram (Doutora)

Prof.^a Karine Araújo Damasceno (Doutora)

Prof. Paulo César Jark (Doutor)

FOLHA DE APROVAÇÃO

IDENTIFICAÇÃO DE FENÓTIPOS MOLECULARES E SUA RELAÇÃO COM FATORES CLÍNICO-PATOLÓGICOS, TRATAMENTO E SOBREVIDA EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS

FERNANDA CAMARGO NUNES

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em PATOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Doutor em PATOLOGIA, área de concentração PATOLOGIA INVESTIGATIVA.

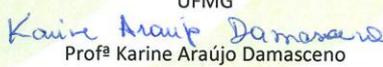
Aprovada em 02 de maio de 2019, pela banca constituída pelos membros

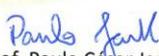

Prof. Geovanni Dantas Cassali – Orientador
UFMG


Prof.ª Gleidice Eunice Lavalle
UFMG


Prof.ª Alessandra Estrela-Lima
UFBA


Prof.ª Débora Balabram
UFMG


Prof.ª Karine Araújo Damasceno
Fiocruz- BA


Prof. Paulo César Jark
Universidade Brasil

Belo Horizonte, 02 de maio 2019

Faculdade de Medicina - UFMG
Campus Saúde
Centro de Pós-Graduação
Av. Professor Alfredo Balena, 190 - 5 andar
Centro - Cep: 301300100
Belo Horizonte - MG
Tel: 3409-9640 - 3403-9641
cpg.ppg.patol@gmail.com

Instituto de Ciências Biológicas - UFMG
Campus Pampulha
Departamento de Patologia Geral
Av. Presidente Antônio Carlos, 6627
Pampulha - Cep: 31270-901
Belo Horizonte - MG
Tel: 3409-2878
dpat@icb.ufmg.br

*Dedico esse trabalho as mulheres
fortes e guerreiras que me incentivam:
minha mãe Maria e minha irmã Aline.*

Partida e chegada

Quando observamos, da praia, um veleiro a afastar-se da costa, navegando mar adentro, impelido pela brisa matinal, estamos diante de um espetáculo de beleza rara.

O barco, impulsionado pela força dos ventos, vai ganhando o mar azul e nos parece cada vez menor.

Não demora muito e só podemos contemplar um pequeno ponto branco na linha remota e indecisa, onde o mar e o céu se encontram.

Quem observa o veleiro sumir na linha do horizonte, certamente exclamará: Já se foi!

Terá sumido?! Evaporado?!

Não, certamente. Apenas o perdemos de vista.

O barco continua do mesmo tamanho e com a mesma capacidade que tinha, quando estava próximo de nós.

Continua tão capaz, quanto antes, de levar ao porto de destino os ensinamentos recebidos.

O veleiro não evaporou, apenas está distante. Mas ele continua o mesmo.

E talvez, no exato instante em que alguém diz: Já se foi, haverá outras vozes, mais além, a afirmar: Lá vem o veleiro.

Extraído e adaptado do Livro "A Reencarnação Através dos Séculos"

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a cada um de vocês, anjos e amigos, que a espiritualidade colocou no meu caminho para me amparar e me dar forças. Foram muitos os momentos difíceis, mas também momentos de alegrias e em todos eles vocês estavam ao meu lado, segurando minhas mãos e não me deixaram desistir. Sem cada um de vocês esse trabalho não seria possível.

As minhas mães Maria e Aline, vocês são a minha fortaleza. Obrigada por me motivar, entender as minhas faltas e momentos de reclusão. Amo vocês!

Ao meu pai José Antônio que sempre torceu por mim e me ajudou a concretizar os meus sonhos.

A minha amiga Gleidice, trilhar esse caminho sem você não seria possível. Sua busca constante por sempre tentar fazer algo a mais, priorizando a ética e a qualidade de vida dos pacientes, me inspira. Obrigada pelo carinho, energia, força, dedicação e conselhos. Te amo mamis poderosa!

Ao meu orientador e amigo Geovanni Cassali por todas as oportunidades, pela paciência, puxões de orelha e contribuições para a minha formação pessoal e profissional. Obrigada por tudo!!!

A minha querida amiga Angélica Bertagnolli, és muito mais que uma coorientadora. És uma mulher forte, com um coração puro e sempre disposta a ajudar. Tenho muita admiração por você e pela leveza e determinação que você conduz o seu trabalho. Aprendi muito com a nossa convivência e se hoje eu amo patologia e necropsia, devo isso a você! Obrigada por concretizar comigo esse trabalho!

Aos professores e professoras do PPG em Patologia pelos ensinamentos e convivência.

A equipe de oncologia do HV- UFMG que brilha mais que o sol: Gleidice, Miriã, Sté, Carlota, Arthur, Adônis, Bia e Rúbia!

Aos amigos do LPC Cecília, Conrado, Diego, Karine, Lili, Lidi, Istéfanni, Marina, Émerson, Iara, Ana, Josy, Fernanda Freitas e Isabel por serem companheiros em todos os momentos!

A Taty não somente por ter me ensinado a fazer imuno, mas por todos os momentos de convivência, risadas, por saber ouvir e ser porta voz em muitos momentos. Saudades, mas muito feliz por você estar longe!!

Aos amigos do LPL pelos bons momentos de descontração.

As minhas super amigas Stéfane e Miriã pelo amor, generosidade e companheirismo todos os dias e para sempre também via Top Secret!!

A Débora Balabram por muitas das vezes que tirou minhas dúvidas e pela sua disposição em ajudar.

As minha amigas do IPVDF Gio, Fabi, Cris e Marina pelas nossas conversar, almoços, cafés e muitas risadas.

Estendo meus agradecimentos a todos funcionários do IPVDF e colegas do laboratório de histopatologia: Mário, Lucas, Thais, Priscila e Klaus.

Aos meus anjinhos Arthur (in memorian), Lourinho, Saci, Odete e minha princesinha e companheira Cintia Linda.

A todos os tutores e pacientes do Hospital Veterinário da UFMG.

A banca pela disponibilidade e contribuições.

À CAPES, CNPq, FAPEMIG e UFMG, por ter permitido todo o trabalho possível.

A todos vocês, serei eternamente grata!

Axé!!!

Este trabalho foi realizado em três locais distintos:

Hospital Veterinário, Setor de Oncologia, Escola de Veterinária, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

Laboratório de Patologia Comparada do Departamento de Patologia Geral- Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG).

Laboratório de Histopatologia do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária da Secretaria de Agricultura, Pecuária e Irrigação (DDPA/SEAPI).

Apoio financeiro: CNPq, FAPEMIG e CAPES:



Instituto de Pesquisas Veterinárias
Desidério Finamor
IPVDF

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	17
LISTA DE ABREVIATURAS.....	19
RESUMO.....	21
ABSTRACT.....	22
1.INTRODUÇÃO.....	23
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1. <i>Neoplasias mamárias canina.....</i>	<i>25</i>
2.2. <i>Classificação histológica.....</i>	<i>26</i>
2.3. <i>Prognóstico.....</i>	<i>27</i>
2.3.1. <i>Marcadores tumorais.....</i>	<i>29</i>
2.3.2. <i>Receptores hormonais.....</i>	<i>29</i>
2.3.3. <i>Fator de crescimento epidérmico humano.....</i>	<i>30</i>
2.3.4. <i>Índice de proliferação celular.....</i>	<i>31</i>
2.3.5. <i>Cicloxigenase.....</i>	<i>32</i>
2.3.6. <i>Citoqueratinas.....</i>	<i>333</i>
2.4. Classificação molecular do câncer de mama na mulher.....	33
2.5. Classificação molecular do câncer de mama em cadelas.....	36
2.6. Tratamento.....	40
3. JUSTIFICATIVA.....	42
4. HIPÓTESE.....	42
5. OBJETIVOS.....	43
5.1. Objetivo geral.....	43
5.2. Objetivos específicos.....	43
6. METODOLOGIA.....	43
6.1. Comitê de ética.....	43

6.2.	População.....	43
6.3.	Estadiamento clínico.....	44
6.4.	Histopatologia.....	44
6.5.	Grau histológico.....	45
6.6.	Imuno-histoquímica.....	45
6.7.	Quantificação da imunorreatividade.....	46
6.8.	Imunofenótipo.....	47
6.9.	Acompanhamento.....	48
6.10.	Tratamento.....	49
6.11.	Análise estatística.....	49
7.	RESULTADOS.....	50
	Artigo 1 - Immunophenotypes of canine mammary tumors: clinical-pathological characteristics and survival.....	51
	Artigo 2 - Expressão de ER, PR, Ki67 e COX-2 definem diferentes grupos com impacto no tratamento e na sobrevida específica em neoplasias mamárias caninas.....	83
8.	CONCLUSÕES GERAIS.....	106
9.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	108
10.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
11.	ANEXOS.....	119
	ANEXO I - Carta de aprovação do CETEA/UFMG.....	119
	ANEXO II - Atividades desenvolvidas no período do doutorado (Maio de 2015 a Abril de 2019).....	120

LISTA DE FIGURAS

Artigo 1 - Immunophenotypes of canine mammary cancer: clinicopathological characteristics and survival

Figure 1 Immunohistochemical expression of the different proteins studied by IHC in canine mammary tumors. A- ER staining; B- PR staining; C-Ki67 staining; D- HER2 staining; E- CK5/6 staining; F- EGFR staining.....61

Figure 2 Kaplan-Meier survival curve of female dogs with mammary tumors according to the immunophenotype treated with surgery alone (n=107 cases). A- Specific survival: Luminal A: median: 950 days; Luminal B HER2-:median: 186 days; Luminal B HER2+: median:102 days; Triple-negative: median: 120 days, P= 0.0402; B – disease-free interval: Luminal A: median: 950 days; Luminal B HER2-:median: 180 days; Luminal B HER2+: median: 68 days; Triple-negative: median: 120 days, P=0.0249; C- Overall survival: Luminal A: median: 434 days; Luminal B HER2-:median: 180 days; Luminal B HER2+: median: 102 days; Triple-negative: median: 120 days, P=0.022.....64

Figure 3 Kaplan-Meier specific survival curve of female dogs with mammary tumors according to the immunophenotypes treated with surgery alone according to clinical stage inicial (I-III) or advanced (IV-V). A- Luminal A: Stage I-III, did not reach the median survival and stage IV-V, median: 950 days, P= 0.0334; B- Luminal B HER2- Stage I-III, did not reach the median survival and stage IV-V, median:120 days, P=0.0175; C- Luminal B HER2+ Stage I-III, did not reach the median survival and stage IV-V, median: 91days, P=0.0344; D- Triple-negative Stage I-III, median: 187ndays) and stage IV-V, median: 98 days, P>0.6539.....66

Artigo 2 – Expressão de ER, PR, Ki67 e COX-2 definem diferentes grupos com impacto no tratamento e na sobrevida específica em neoplasias mamárias caninas agressivas

Figura 1 Curva de sobrevida específica de Kaplan-Meier de cadelas com neoplasias mamárias em estadio I-III de acordo com marcadores imuno-histoquímicos: A – Receptores de estrógeno (P=0.0412) negativo não atinge a mediana e positivo mediana aos 132 dias, B- Receptores de

progesterona negativo mediana aos 78 dias e positivo não atinge a mediana (P=0.0346), C- Índice de proliferação celular Ki67 (P= 0.0129) baixo não atinge a mediana e alto mediana aos 180 dias. D- Cicloxigenase- 2 (0.0082) baixo não atinge a mediana e alto mediana aos 147 dias.....93

Figura 2 Curva de sobrevida de cadelas com neoplasias mamárias caninas de acordo com subtipos prognóstico de expressão de RE/RP, Ki67 e COX-2. Grupo 1: RE/RP+, Ki67<20% e COX-2 de escore baixo (1-5), n=20, não atinge a mediana; Grupo 2: RE/RP+, Ki67>20% ou COX-2 elevado, n=28, mediana de 153 dias; Grupo 3: RE/RP+, Ki67> 20% e COX-2 alto (6-12), n=14, mediana de 147 dias; Grupo 4: RE/RP-, Ki67<20% e COX-2 baixo, n=9, mediana aos 187 dias; Grupo 6: RE/RP-, Ki67>20% e COX-2 elevado (6-12), n=2, mediana aos 120 dias (P= 0.0125).....94

Figura 3 Curva de sobrevida de subtipos prognóstico de expressão de RE/RP, Ki67 e COX-2 de acordo com o tratamento. **A-** Grupo 1 em estágio inicial: cirurgia, cirurgia + quimioterapia e cirurgia + quimioterapia + metronômica não atingem a mediana (P=0.9519); **B-** Grupo 1 em estágio avançado: cirurgia, cirurgia + quimioterapia e cirurgia + quimioterapia + metronômica não atingem a mediana (P=0.8596); **C-** Grupo 2 em estágio inicial: cirurgia mediana aos 180; cirurgia + quimioterapia: mediana aos 868 dias; cirurgia + quimioterapia e quimioterapia metronômica: não atinge a mediana (P=0.5274) **D-** Grupo 2 em estágio avançado: cirurgia 84 dias, cirurgia + quimioterapia 207 dias e cirurgia + quimioterapia e quimioterapia metronômica 314 dias (P=0.2358) **E-** Grupo 3 em estágio inicial cirurgia: 180 dias cirurgia + quimioterapia: 242 dias cirurgia + quimioterapia+ metronômica: não atinge a mediana (P=0.4083); **F-** Grupo 3 em estágio avançado: Cirurgia mediana aos 120 dias, cirurgia + quimioterapia mediana aos 145 dias; cirurgia + quimioterapia + metronômica: não atinge e mediana; (P=0.0045) **G-** Grupo 4 em estágio avançado: Cirurgia mediana aos 98 dias, cirurgia + quimioterapia mediana aos 431 dias; cirurgia + quimioterapia + metronômica: não atinge a mediana (P=0.0310).....96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação histológica das NMC de acordo com CASSALI et al. (2014).....	26
Tabela 2 - Estadiamento clínico para cadelas com tumores mamários de acordo com o sistema TNM, estabelecido pela OMS, (adaptado de SORENMO et al., 2013).....	28
Tabela 3 - Classificação dos subtipos moleculares carcinomas invasivos da mama mulheres segundo a classificação de St, Gallen 2011 e 2013 (Adaptado de SERRA et al., 2014).....	36
Tabela 4 - Sistema de classificação molecular para tumores mamários caninos de acordo com estudos realizados de 2008 a 2017.....	39
Tabela 5 - Critérios de determinação da positividade dos marcadores imuno-histoquímicos para classificação molecular de neoplasias mamárias de cadelas.....	40
Tabela 6 - Anticorpos primários utilizados nas reações de imuno-histoquímica.....	46
Tabela 7 - Interpretação imuno-histoquímica para EGFR e HER2 proposto pela Associação Americana de Oncologia e o Colégio Americano de Patologistas (WOLFF et al.,2013).....	47
Tabela 8 - Classificação imuno-histoquímica em subtipos de neoplasias mamárias caninas.....	48

Artigo 1 - Immunophenotypes of canine mammary tumors: clinical-pathological characteristics and survival

Supplementary material 1 Immunohistochemical classification in canine mammary tumor subtypes.....58

Supplementary material 2 Immunohistochemical markers and immunophenotypic classification of canine mammary tumor.....60

Table 1 Clinical-pathological data of female dogs with malignant mammary tumors according to immunophenotypes.....63

Table 2 Univariate analysis comparing clinical and histopathological aspects of canine mammary tumors.....67

Table 3 Multivariate analysis comparing clinical and histopathological aspects, included in the final model, of canine mammary tumors.....69

Table 4 Univariate and multivariate analysis comparing clinical and histopathological aspects of canine mammary tumors with immunophenotypes Luminal A.....71

Table 5 Univariate and multivariate analysis comparing clinical and histopathological aspects of canine mammary tumors with immunophenotypes Luminal B HER2-.....73

Artigo 2 – Expressão de ER, PR, Ki67 e COX-2 definem diferentes grupos com impacto no tratamento e na sobrevida específica em neoplasias mamárias caninas agressivas

Tabela 1- Dados clínico-patológicos de cadelas com neoplasias mamárias (n=130).....88

Tabela 2 - Distribuição da frequência das neoplasias mamárias caninas em grupos de imunoprognóstico.....92

Tabela 3 - Análise uni e multivariada de sobrevida específica de cadelas com neoplasias mamária, tratadas somente com cirurgia (n=73).....95

LISTA DE ABREVIATURAS

AFIP	Armed Forces Institute of Pathology
BD	Dimerização
CISH	Hibridização cromogênica <i>in situ</i>
CK	Citoqueratinas
CK5/6	Citoqueratina 5/6
CM	Carcinoma micropapilar
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
COX-3	Ciclooxigenase-3
CPI	Carcinoma papilar invasor
CS	Carcinoma sólido
CSS	Carcinossarcoma
CT	Carcinoma tubular
CTM	Carcinoma em tumor misto
DAB	Diaminobenzidina
DFI	Intervalo livre de doença
DFS	Disease-free interval
DMT	Dose máxima tolerável
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementar
EGFR	Receptor de fator de crescimento epidérmico
FDA	Food and Drug Administration
FISH	Hibridação fluorescente <i>in situ</i>
G1	Gap 1 (primeiro intervalo no ciclo celular)
H&E	Hematoxilina e eosina
HER1	Receptor de fator de crescimento epidérmico 1
HER2	Receptor de crescimento epidérmico humano 2
HER3	Receptor de fator de crescimento epidérmico 3
HER4	Receptor de fator de crescimento epidérmico 4
HR	Hazard ratio
HV	Hospital veterinário
ICB	Instituto de Ciências Biológicas

IHC	Imuno-histoquímica
ISH	Hibridação <i>in situ</i>
kDa	Kilo-daltons
KI67	Índice de proliferação celular
LLD	Latero lateral direita
LLE	Latero lateral esquerda
LPC	Laboratório de Patologia Comparada
M	Mitose
NMC	Neoplasias mamárias caninas
OMS	Organização Mundial da Saúde
OS	Sobrevida global
PBS	Tampão fosfato salino
PCNA	Antígeno de proliferação celular
pH	Potencial hidrogeniônico
RE	Receptor de estrógeno
RP	Receptor de progesterona
S	Síntese
SS	Sobrevida específica
TK	Tirosina-cinase
TMC	Tumores mamários caninos
TNM	Tumor, linfonodo e metástase
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VD	Ventro dorsal

RESUMO

Estabelecer o prognóstico em cadelas com neoplasias mamárias é um grande desafio, pois este é influenciado por diversos fatores clínicos e patológicos. Em medicina humana a classificação molecular das neoplasias mamárias de mulheres é recomendada pelo Consenso Internacional de Especialistas em Câncer de Mama - *St. Gallen*. Tendo em vista que o emprego do Sistema *St Gallen*, preconizado na medicina humana, ainda não foi empregado para a classificação molecular das neoplasias mamárias caninas, o objetivo do presente estudo foi caracterizar o imunofenótipo dessas neoplasias de acordo com a classificação de *St Gallen*. Assim sendo, um painel imunohistoquímico para RE, RP, Ki67, HER2, CK5/6 e EGFR foi empregado para a definição dos imunofenótipos em 170 neoplasias mamárias malignas e definiu os subtipos: luminal A (32%), luminal B HER2- (51%), luminal B HER2+ (5%) e Triplo negativo (12%). Melhor prognóstico foi associação ao subtipo luminal A em relação aos demais imunofenótipos, esse subtipo também foi associado a estágio clínico inicial (I-III) e maior frequência de carcinomas em tumores mistos. Enquanto carcinoma sólido e carcinoma micropapilar foram associados ao subtipo Luminal B HER2-. Luminal B HER2+ foi o subtipo de pior prognóstico com menor tempo de sobrevida e maior risco de óbito. Na segunda etapa do presente estudo, objetivou-se avaliar a expressão de RE, RP, Ki67 e COX-2 para a definição de subtipos imunoprognósticos com implicações na resposta terapêutica. A avaliação de RE/RP, Ki67 e COX2 em 130 neoplasias mamárias de cadelas permitiu definir um melhor prognóstico associado as neoplasias com positividade para RE/R, Ki67<20% e baixo escore de COX-2. Maior risco de óbito foi associado a neoplasias com RE/RP+, Ki67 >20% e alto escore de COX-2 e RE/RP-, Ki67>20% e alto escore de COX-2. O estudo demonstrou que os diferentes imunofenótipos apresentam implicações no prognóstico de cadelas com neoplasias mamárias malignas. Os subtipos luminais foram predominantes, sendo descrito pela primeira vez o subtipo luminal B HER2+ e melhor prognóstico foi associado ao luminal A. A avaliação coordenada dos marcadores RE/RP, Ki67 e COX2 em neoplasias mamárias caninas contribui para categorizar as pacientes em diferentes grupos imunoprognóstico e para selecionar pacientes que se beneficiarão de terapias adjuvantes.

Palavras-chave: imunoprognóstico, cadelas, luminais, triplo negativo, quimioterapia

ABSTRACT

Establishing the prognosis in female dogs with mammary neoplasms is a great challenge because it is influenced by several clinical and pathological factors. In medicine the molecular classification of breast neoplasms of women is recommended by the International Consensus of Breast Cancer Specialists - St. Gallen. Considering that the use of the St Gallen System, as recommended in human medicine, has not yet been used for the molecular classification of canine mammary neoplasms, the objective of the present study was to characterize the immunophenotype of these neoplasms according to the classification of St Gallen. Thus, an immunohistochemical panel for RE, RP, Ki67, HER2, CK5/6 and EGFR was used to define the immunophenotypes in 170 malignant mammary neoplasms and defined subtypes: luminal A (32%), luminal B HER2- (51%), luminal B HER2 + (5%) and Triple negative (12%). A better prognosis was associated to the luminal A subtype in relation to the other immunophenotypes, this subtype was also associated with the initial clinical stage (I-III) and higher frequency of carcinomas in mixed tumors. While solid carcinoma and micropapillary carcinoma were associated with the Luminal B HER2- subtype. Luminal B HER2 + was the subtype of worse prognosis with shorter survival time and higher risk of death. In the second stage of the present study, we aimed to evaluate the expression of RE, RP, Ki67 and COX-2 for the definition of immunoprogntic subtypes with implications for the therapeutic response. The evaluation of RE/RP, Ki67 and COX2 in 130 breast neoplasms of female dogs allowed to define a better prognosis associated with neoplasms with RE / R positivity, Ki67 <20% and low COX-2 score. Higher risk of death was associated with neoplasms with RE / RP +, Ki67 > 20% and high score of COX-2 and RE / RP-, Ki67 > 20% and high COX-2 score. The study demonstrated that the different immunophenotypes have implications for the prognosis of female dogs with malignant mammary cancers. The luminal subtypes were predominant, and the luminal B HER2 + subtype was described for the first time and a better prognosis was associated with luminal A. The coordinated evaluation of RE/RP, Ki67 and COX2 markers in canine mammary neoplasms contributes to categorize patients in different immunoprogntic groups and to select patients who will benefit from adjuvant therapies.

Key-words: immunoprogntic, female dogs, luminal, triple negative, chemotherapy

1. INTRODUÇÃO

O comportamento biológico das neoplasias mamárias em cadelas é consideravelmente variável, sendo o prognóstico influenciado por diversos fatores como: idade da paciente no momento do diagnóstico, tipo histológico, estadió clínico, tamanho tumoral, índice mitótico, grau histológico, metástase regional ou à distância, densidade de microvasos e marcadores moleculares (CASSALI et al., 2014; SORENMO, 2003). A definição do prognóstico somente com base em parâmetros clínicos e morfológicos foi apontada como um desafio para clínicos e patologistas em relação ao câncer de mama na mulher. Essa necessidade de se obter grupos mais homogêneos com relação ao prognóstico motivou a classificação do câncer de mama na mulher de acordo com os perfis de expressão gênica (PEROU et al., 2000; SORLIE et al., 2001; GOLDBIRSCHE et al., 2011).

Na medicina humana, desde a sua classificação, o perfil molecular fez com que o câncer de mama deixasse de ser uma doença única e passou a ser analisado como um conjunto de doenças com fatores de risco e com prognósticos distintos (PEROU et al., 2000; MCDERMOTT et al., 2011; GOLDBIRSCHE et al., 2011; REIS-FILHO & PUSZTAI, 2011; EROLES et al., 2012). Além disso, essa classificação molecular permite um tratamento direcionado para mulheres com câncer de mama. Desde 2011, Consenso Internacional de Especialistas em Câncer de Mama de *St. Gallen* (Goldhirsch et al., 2011) reconhece a utilidade da classificação molecular na decisão terapêutica e na emissão de um prognóstico. Além disso, estabelece que os diferentes subtipos de câncer de mama na mulher podem ser definidos com base numa variedade de testes genéticos ou numa aproximação com o recurso da imuno-histoquímica (GOLDBIRSCHE et al., 2011).

Essas possibilidades de melhor compreensão do comportamento biológico e de se estabelecer um prognóstico mais assertivo despertaram o interesse em diversos investigadores para a classificação molecular em neoplasias mamárias de cadelas (GAMA et al., 2008; SASSI et al., 2010, RIBEIRO et al., 2012, ABADIE et al., 2017). O primeiro estudo, descrito por GAMA et al., (2008), classifica os tumores mamários caninos em: luminal A, luminal B, Basal, HER2 superexpresso e fenótipo negativo. Estudos posteriores descrevem os subtipos luminal A, luminal B, basal-like e triplo negativo (SASSI et al., 2010; RIBEIRO et al., 2012, KIM et al., 2013; ABADIE et al., 2017). Esses resultados demonstram que a classificação molecular, por meio de marcadores imuno-histoquímicos, é uma ferramenta possível de ser adotada para

tumores mamários caninos. Embora existam diversas publicações a respeito da classificação molecular em neoplasias mamárias caninas, a sua utilização como marcador prognóstico e preditivo permanece inalcançada. O principal fator limitante é a inexistência de um painel imuno-histoquímico adequado para o seu estudo. Os estudos realizados empregam diferentes marcadores e critérios para avaliação de imunorreatividade de cada marcador, conseqüentemente os resultados são divergentes quanto à frequência e o prognóstico dos imunofenótipos (GAMA et al., 2008; SASSI et al., 2010, RIBEIRO et al., 2012, ABADIE et al., 2017).

Como alternativa, o emprego de uma classificação que adota um painel imuno-histoquímico com marcadores padronizados e com valor prognóstico bem estabelecido como o *St Gallen* seria o indicado. Dessa maneira, o presente trabalho objetivou caracterizar o imunofenótipo das neoplasias mamárias em cadelas, descrevendo sua relação com os fatores clínico-patológicos, tratamento e sobrevida bem como, propor um painel de marcadores com valor prognóstico e preditivo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Neoplasias mamárias caninas

Neoplasias mamárias caninas (NMC) são lesões frequentemente diagnosticadas em cadelas, representando de 50-70% de todos os tumores que ocorrem nesta espécie (MOE, 2001; MERLO et al., 2008). A ocorrência é decrescente em certas áreas geográficas onde a prática de castração precoce é bem estabelecida (SLEECKX et al., 2011). No Brasil, estudos mostram que a ocorrência de neoplasias mamárias malignas pode variar entre 60-90% entre as cadelas com tumores mamários (OLIVEIRA et al., 2003; OLIVEIRA FILHO et al., 2010; TORÍBIO et al., 2012, NUNES et al., 2018). Nos países da Europa, a incidência de tumores malignos varia dependendo da região. Na Suíça, foi descrita incidência em torno de 47% (GRÜNTZIG et al., 2015), enquanto que na Itália relatou-se uma incidência de aproximadamente 70% (VASCELLARI et al., 2016). Contudo, a literatura americana infere que a frequência de tumores mamários malignos em cadelas seja em torno de 50% (SORENMO, 2003; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013).

A etiologia das NMC é multifatorial, incluindo fatores nutricionais, genéticos e hormonais (PHILIBERT et al., 2003; SORENMO et al., 2011; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013). O risco de desenvolvimento das NMC aumenta com a expectativa de vida e as cadelas entre 9 a 11anos são as mais susceptíveis (SORENMO et al., 2013). A exposição hormonal é apontada como o principal fator de risco, uma vez que sob condições fisiológicas o estrógeno promove o crescimento ductal, enquanto a progesterona induz o desenvolvimento alveolar das glândulas mamárias com hiperplasia de células secretoras e mioepiteliais (RUTTEMAN et al., 1991). Considera-se que esse efeito proliferativo no epitélio possa criar condições para a proliferação neoplásica (SORENMO et al., 2000; QUEIROGA et al., 2005).

Os tumores mamários são identificados macroscopicamente como nódulos únicos ou múltiplos em uma ou mais glândulas mamárias. É comum que as glândulas abdominais caudais e inguinais sejam mais frequentemente acometidas, devido a maior concentração de parênquima mamário nessas mamas (MISDORP, 2002). De acordo com o grau de desenvolvimento e com o comportamento biológico uma variação na dimensão tumoral pode

ser observada, podendo ocorrer aderência à pele e ulcerações (BOSTOCK, 1986; SORENMO et al., 2009; CASSALI et al., 2014).

2.2. Classificação histológica

A classificação dos tumores mamários em cadelas pode ser realizada considerando-se o seu tecido de origem (epitelial, mioepitelial, ou tecido mesenquimal), as suas características morfológicas e seu prognóstico. Os métodos de classificação histológica dos tumores mamários em cadelas variam consideravelmente, tornando difícil a comparação entre estudos a respeito do comportamento biológico das neoplasias malignas (BENJAMIN et al., 1999; SARLI et al., 2002). Várias classificações têm sido propostas, em 1974 a Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou a primeira “Classificação Histológica Internacional de Tumores dos Animais de Companhia (HAMPE et al., 1974), que incluiu neoplasias e displasias da glândula mamária. Em 1999 uma revisão da classificação original foi publicada pela *Armed Forces Institute of Pathology* (AFIP; MISDORP et al. 1999), a qual tem sido a mais utilizada e seu sistema de classificação combina características histogênicas e morfológicas, além de considerar as características histológicas importantes para o prognóstico da lesão. Posteriormente, CASSALI et al. (2011) e GOLDSCHMIDT et al. (2011) revisaram as classificações incluindo outros subtipos histológicos. O *Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors* (CASSALI et al. (2014) contempla uma classificação abrangente com subtipos não descritos por MISDORP et al. (1999), conforme tabela 1.

Tabela 1 - Classificação histológica das neoplasias de glândulas mamárias em cadelas de acordo com CASSALI et al. (2014).

Neoplasias Mamárias Benignas

Adenoma

Adenomioepitelioma

Adenoma basalóide

Fibroadenoma

Papiloma ductal

Tumor misto benigno

Neoplasias Mamárias Malignas

Carcinoma *in situ* ductal ou lobular

Carcinoma em tumor misto
Carcinoma papilar
Carcinoma tubular
Carcinoma sólido
Carcinoma cribriforme
Carcinoma micropapilar
Carcinoma lobular invasor
Carcinoma lobular pleomórfico
Carcinoma secretor
Carcinoma mucinoso
Carcinoma rico em lipídeos
Carcinoma de células fusiformes
Carcinoma de células escamosas
Carcinoma com diferenciação sebácea
Carcinoma basalóide
Tumor filóides maligno
Adenomioepitelioma maligno
Fibrossarcoma
Osteossarcoma
Carcinossarcoma
Sarcoma em tumor misto
Condrossarcoma
Lipossarcoma
Hemangiossarcoma

2.3. Prognóstico

Consideram-se fatores prognósticos em câncer de mama as características clínicas e os aspectos biológicos e patológicos específicos de cada indivíduo, os quais permitem prever a evolução da doença ou a sobrevivência das pacientes que não tenham sido submetidas a terapias adjuvantes após a cirurgia (CASSALI et al., 2014).

O estadiamento clínico para NMC além de determinar a extensão da doença e estabelecer o prognóstico, permite planejar um tratamento adequado para cada paciente. Determinado de acordo com o sistema TNM, estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OWEN, 1980), o estadiamento clínico leva em consideração o tamanho do tumor primário (T),

envolvimento de linfonodos regionais (N) e a presença de metástases à distância ou em linfonodos não associados com a drenagem linfática da glândula mamária (M) (Tabela 2).

Tabela 2- Estadiamento clínico para cadelas com tumores mamários de acordo com o sistema TNM, estabelecido pela OMS, (adaptado de OWEN, 1980).

Estadio clínico	T	N	M
I	T₁	N₀	M₀
II	T₂	N₀	M₀
III	T₃	N₀	M₀
IV	T_{1,2,3}	N₁	M₀
V	T_{1,2,3}	N_{0,1}	M₁

T₁: <3,0cm, T₂: 3,0-5,0cm, T₃: >5,0 cm; N₀: ausência de metástase nodal.

N₁: presença de metástases nodal; M₀: ausência de metástase distante.

M₁: presença de metástase distante.

O tamanho tumoral é um fator prognóstico independente em NMCs. Melhor prognóstico está correlacionado com tumores menores do que 3,0 cm (T₁) quando comparado a tumores maiores do que 3,0 cm (T₂ e T₃). Este parâmetro tem a vantagem de ser facilmente obtido e deve ser considerado na decisão da abordagem cirúrgica (SORENMO, 2003. HORTA et al., 2014). Na avaliação de neoplasias mamárias benignas e malignas, em cadelas, Ferreira et al. (2009) observaram que a maioria das lesões acima de 5.0 cm (T₃) era maligna, apresentava índice de proliferação celular elevado e menor positividade para receptores de progesterona (RP), quando comparados com tumores menores (T₁, T₂).

A presença de metástases em linfonodos regionais também confere um impacto sobre a sobrevida das pacientes, contribuindo para um prognóstico desfavorável (SORENMO, 2003; DE ARAÚJO et al., 2016, NUNES et al., 2018). Pacientes em estadio V apresentam o pior prognóstico em relação aos animais que apresentam estadios iniciais (YAMAGAMI et al., 1996; CHANG et al., 2005; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013). Na análise de sobrevida uma mediana de sobrevida pós-cirúrgica de cinco meses foi relatada em pacientes com metástases à distância, quando comparados aos 28 meses para animais sem evidência de metástase no momento do diagnóstico (PHILIBERT et al., 2003).

Tipos histológicos como carcinoma sólido, carcinoma micropapilar, carcinosarcomas ou sarcomas são associadas a pior desfecho clínico (CASSALI et al., 2014). Os carcinomas micropapilares, sólidos, tubulares e carcinosarcomas apresentaram uma menor sobrevida global quando comparados aos carcinomas em tumores mistos e carcinomas papilares (NUNES, 2014; NUNES et al., 2019). Os carcinosarcomas e sarcomas estão associados a um pior prognóstico, com maior alto risco de desenvolver metástases e de mortalidade no primeiro ano pós-cirurgia quando comparados aos demais tipos histológicos (BENJAMIN et al., 1999; SANTOS et al., 2013).

As neoplasias menos diferenciadas também são associadas com pior prognóstico. KARAYANNOPOULOU et al. (2005) utilizaram o método de graduação histológica proposto por ELSTON & ELLIS (1991) para avaliar 85 carcinomas mamários caninos, e observaram uma relação estatisticamente significativa entre o grau histológico e a sobrevida dos indivíduos. De acordo com os resultados, cadelas com neoplasias de grau III apresentaram um risco de morte 21 vezes maior em relação às cadelas com tumores classificados como grau I. Na avaliação de sobrevida as cadelas com neoplasias mamárias malignas de grau I e II apresentaram melhor prognóstico com maior tempo de sobrevida em relação a cadelas com neoplasias de grau III (NUNES et al., 2018). De acordo com DUTRA et al (2008), o grau histológico e a contagem mitótica são bons fatores prognósticos independentemente.

2.3.1. Marcadores tumorais

2.3.2. Receptores hormonais

Estrógeno e progesterona desempenham papel fundamental no desenvolvimento e maturação das glândulas mamárias de cadelas funcionando como indutores da proliferação do epitélio intralobular ductal (SORENMO et al., 2013). Desde a puberdade, o estrógeno e a progesterona estimulam as células mamárias normais, com o intuito de progredir com o desenvolvimento da glândula na fase púbere e, posteriormente, prepará-la para a lactação, terminando o completo desenvolvimento da glândula mamária. Este efeito proliferativo cíclico, sob o epitélio ocorre repetidamente em cada ciclo estral favorecendo as mutações e o risco de desenvolvimento de neoplasias mamárias é determinado pela intensidade e duração

da exposição do epitélio mamário à ação conjunta de estrógeno e progesterona (RUTTEMAN et al., 1990; QUEIROGA et al. 2005; SORENMO et al. 2013).

As neoplasias epiteliais podem apresentar receptores hormonais (estrógeno – RE e progesterona – RP) a expressão desses receptores diminui progressivamente a partir de lesões hiperplásicas/displásicas, neoplasias benignas e neoplasias malignas em comparação com a mama normal, havendo assim relação inversa entre a expressão destes receptores e o grau de diferenciação histológica. (CHANG et al., 2009). Nas células neoplásicas, a interação entre o estrógeno e o receptor estimula a liberação de fatores de crescimento, o que leva ao aumento da proliferação celular (SORENMO et al., 2013).

2.3.3. Fator de crescimento epidérmico humano

A família ErbB (também chamada de família HER; do inglês *Human Epidermal Receptor*, ou receptor de fator de crescimento humano) compreende quatro receptores distintos: EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*; também chamado de c-erbB-1 ou HER1), HER-2 (ou c-erbB-2), HER-3 (ou c-erbB-3) e HER-4 (ou c-erbB-4). Esses receptores são glicoproteínas transmembranares que possuem três domínios distintos: um extracelular, responsável por reconhecer o ligante (fator de crescimento) e por permitir a formação de dímeros, por meio do braço de dimerização (BD); um domínio transmembranar que ancora a proteína à membrana e um domínio intracelular citoplasmático, com atividade tirosina-cinase (TK). Diferentes ligantes ativam o receptor por ligação ao domínio extracelular e induzem a formação de homodímeros ou heterodímero. HER2 é geralmente expresso em baixos níveis nas células epiteliais e mesenquimais de diversos tecidos, nos quais participam na regulação do desenvolvimento, crescimento e diferenciação celular. Na mama normal HER2 é importante para a expansão alveolar e secreção do leite no final da gestação e na lactação (JONES et al., 1999)

Na espécie canina o gene *HER-2* está localizado no cromossomo 1q13.1 (MURUA et al., 2001). A superexpressão de HER-2 foi observada em lesões mamárias pré-malignas e carcinomas ductais *in situ* de humanos e cadelas sugerindo que a desregulação desta proteína está envolvida com os processos iniciais da carcinogênese (XU et al., 2002; SILVA et al., 2014). Ao ser fosforilado, o domínio TK dispara diversas cascatas de sinalização intracelular

como as vias RAS/RAF/MAPK, mTOR e PI3K alterando atividades que levam à progressão de tumores malignos como a proliferação celular, inibição da apoptose, migração, invasividade, angiogênese e perda da adesão (GUTIERREZ; SCHIFF, 2011; KRISHNAMURTI; SILVERMAN, 2014). A expressão elevada da proteína HER-2 tem sido observada em 17% a 36% dos carcinomas mamários caninos (RUNGSIPIPAT et al., 1999; DE LAS MULAS et al., 2003; DUTRA et al., 2004; HSU et al., 2009; RESSEL et al., 2013), porém a relevância prognóstica da superexpressão de HER-2 ainda é controversa. De las Mulas et al (2003) verificaram associação da superexpressão de HER-2 com pior prognóstico, enquanto que outros autores não observaram essa associação (DUTRA et al, 2004). Em outros estudos foi observado que animais com neoplasias mamárias com superexpressão do HER-2 tiveram maior tempo de sobrevivência (RESSEL et al., 2013; HSU et al., 2009). Contudo, esses estudos demonstraram associação entre a superexpressão de HER-2 e características de malignidade como alto índice mitótico e alto grau histológico (DE LAS MULAS et al., 2003; DUTRA et al., 2004; RESSEL et al., 2013).

O gene *EGFR* localiza-se no cromossomo 7p11.2-p2 e codifica uma proteína de 170 kDa (DOWNWARD et al., 1984). O receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) tem sido detectado em neoplasias mamárias caninas usando diferentes metodologias e sua expressão elevada também está relacionada com fatores prognósticos adversos como alto grau histológico, elevado tamanho tumoral presença de invasão linfática e negatividade para receptores hormonais (NERUKAR et al., 1987; RUTTEMAN et al., 1994; DONNAY et al., 1996; GAMA et al., 2009; BERTAGNOLLI et al., 2011; KIM et al., 2013; GUIMARÃES et al., 2014).

2.3.4. *Índice de proliferação celular*

O índice de proliferação, determinado por marcadores envolvidos no ciclo celular como o ki67 e o PCNA (Antígeno de proliferação celular) são considerados fatores prognósticos, pois estimam o potencial de proliferação celular das neoplasias e de uma forma geral, tumores com maiores índices proliferativos apresentam curso mais agressivo com aumento do risco de metástases (PEÑA et al., 1998).

Ki67 é uma proteína nuclear, não histona, detectada nas células durante todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e M) que desaparece rapidamente após a mitose (LOPEZ et al., 1991). Considera-se que o Ki67 é o principal marcador prognóstico de índice de proliferação celular em NMC (CASSALI et al., 2014). A quantificação do índice de proliferação celular (Ki67) pelo estudo imuno-histoquímico é um método confiável e de fácil avaliação do crescimento das neoplasias (DUTRA et al., 2008; CASSALI et al., 2014). Peña (1998) encontrou um ponto de corte de 24% para Ki67, acima do qual a probabilidade de desenvolvimento de metástases aumentava em 99%. Verificou-se também existir uma correlação inversa entre a expressão de Ki-67 e a marcação de receptores de progesterona (CASSALI, 2000; SENNAZLI et al., 2015).

2.3.5. *Cicloxigenase*

A ciclooxigenase (COX) é uma classe de enzimas importantes para a conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas. Existem três isoformas para as ciclooxigenases, a Cox-1 é expressa na forma constitutiva e está presente em uma variedade de tecidos exercendo papel importante na homeostase celular. A enzima Cox-2 é induzível e encontrada primariamente no sítio inflamatório e é detectada constitutivamente em poucos tecidos, como rins (mácula densa), sistema nervoso central e placenta (WILLIAMS et al., 1999; DORÉ et al., 2003; ROELOFS et al., 2014). Uma terceira isoforma da ciclooxigenase (COX-3) foi descoberta em 2002, contudo, a sua relevância, tanto na espécie canina como em outras, ainda não foi estabelecida (CHANDRASEKHARAN et al., 2002).

A Cox-2 tem papel importante em uma variedade de neoplasias contribuindo para o desenvolvimento tumoral e angiogênese (DORÉ et al., 2003; LAVALLE et al., 2009; ROELOFS et al., 2014). Ela participa do metabolismo do ácido araquidônico, gerando prostaglandinas que são responsáveis pela proliferação celular, apoptose, modulação do sistema imune e angiogênese (GRÖSCH et al., 2006). MILLANTA et al (2006) observaram associação entre expressão aumentada de Cox-2 com alto grau histológico, superexpressão de HER-2 e pior sobrevida em cadelas com carcinomas mamários. LAVALLE et al (2009) observaram que a alta expressão de Cox-2 em neoplasias mamárias caninas estava associada menor tempo de sobrevida. QUEIROGA et al (2010) observaram que maior expressão de Cox-2 em NMC estava associada com metástase linfonodal e à distância, e pior sobrevida.

GUIMARÃES et al (2014) observaram que expressão elevada de Cox-2 estava associada com elevado tamanho tumoral, alto grau histológico e presença de metástase para linfonodos em carcinomas mamários caninos. Além disso, a expressão de COX-2 apresenta valor preditivo em potencial, tendo em vista a possibilidade da associação de inibidores seletivos da COX-2 (CASSALI et al., 2011; LAVALLE et al., 2012).

2.3.6. *Citoqueratinas*

As citoqueratinas (CKs) são filamentos intermediários proteicos que juntamente com outros filamentos como vimentina, desmina, nestina e neurofilamentos, compõem o citoesqueleto (ARAI et al., 1994; ALBERTS et al., 1999). Além de serem os principais componentes do citoesqueleto, as CKs são muito dinâmicas e estão envolvidas nas vias de sinalização intracelular, sendo marcadores sensíveis para a identificação de células malignas de origem epitelial (ZUCCARI et al., 2004). As citoqueratinas podem ser classificadas de acordo com o seu tipo e ponto isoelétrico em ácidas, básicas ou neutras e de acordo com a massa molecular em baixa ou elevada (MOLL et al., 2008).

Na glândula mamária normal os ductos e alvéolos estão circundados por duas camadas de células: uma interna ou luminal de células secretoras e outra externa, justaposta à membrana basal, denominada camada basal contendo células mioepiteliais (MALZAHN et al, 1998). As células epiteliais luminais caracterizam-se pela expressão de CKs luminais de baixo peso molecular, tais como CK7, CK8, CK18, CK19. A camada externa é formada por células mioepiteliais que expressam citoqueratinas de alto peso molecular como CK5, CK6, CK14 e CK17. A expressão de CK 5/6 em neoplasias mamárias está associada ao fenótipo basal, que caracteriza comportamento biológico mais agressivo.

2.4. Classificação molecular do câncer de mama na mulher

O câncer de mama representa um grupo heterogêneo de tumores com diferentes características biológicas e morfológicas, e variada resposta terapêutica. Historicamente, os sistemas de classificação do câncer de mama foram baseados na avaliação histopatológica, incluindo o tipo e o grau histológico. A complexidade não é totalmente refletida pelos principais parâmetros clínicos (tamanho tumoral, tipo e grau histológico) e marcadores

patológicos (receptor de estrogênio, receptor de progesterona e fator de crescimento epidérmico humano - HER2). De modo que tais fatores não explicam completamente o comportamento, evolução e resposta terapêutica variadas da doença em pacientes apresentando fatores semelhantes, como tipo e grau histológicos, tamanho da neoplasia, status linfonodal, status dos receptores hormonais e do HER2 (PEROU et al., 1999; PEROU et al., 2000). Entretanto, os avanços na pesquisa do genoma humano e em tecnologias moleculares de larga escala começaram a decifrar essa complexidade com base na avaliação das características moleculares das células neoplásicas.

A tecnologia de *microarrays*, ou microarranjos de DNA, possibilitou a avaliação simultânea da expressão de milhares de genes em diferentes tecidos de um determinado organismo. Os dois tipos principais de microarranjos de expressão gênica são os de cDNA e os de oligonucleotídeos. Ambos os tipos de microarranjos são hibridizados com amostras de cDNA ou RNA obtidos dos tecidos de interesse, para avaliar as alterações em seus níveis de expressão (RAKHA et al, 2008).

Perou et al., (2000) partiram do princípio de que a heterogeneidade fenotípica do câncer de mama é acompanhada por uma diversidade de padrões de expressão gênica e por isso avaliaram a expressão simultânea de 496 genes por intermédio dos *microarrays* de cDNA em neoplasias mamárias. O método possibilitou a classificação dos carcinomas mamários em quatro subtipos: Luminal, HER-2-positivo (ou HER-2 sobreexpresso), *Basal-like* e *Normal like*. A partir dessa classificação, os carcinomas que subexpressam RE (RE negativos) e os que superexpressam RE (RE positivos) foram considerados doenças distintas do ponto de vista molecular. O grupo RE positivo é caracterizado por elevada expressão de genes tipicamente expressos pelas células epiteliais luminais da mama (“câncer luminal”). O grupo RE negativo engloba três subgrupos de neoplasias: um com superexpressão de HER2 (HER2 positivo), um que expressa genes característicos das células basais/mioepiteliais da mama normal (câncer basal) e outro cujo perfil de expressão gênica é similar ao do parênquima mamário normal. Estudo subsequente demonstrou uma divisão do grupo Luminal em A e B, incluindo como critério uma maior expressão do gene RE- α no subtipo luminal A enquanto o subtipo luminal B apresentava uma expressão baixa a moderada dos genes especificamente luminais, incluindo o RE. (SORLIE et al., 2001). Posteriormente, foi descrito o subtipo

claudin-low que apresenta as características genômicas do câncer com fenótipo de células-tronco CD44+/CD24-/low (HERSCHKOWITZ et al., 2007; HENNESSY et al., 2009).

A expressão gênica é considerada padrão ouro na avaliação dos subtipos moleculares do câncer de mama, porém, as limitações técnicas e o alto custo dificultam a sua utilização na rotina de diagnóstico. Embora estudos imuno-histoquímicos não forneçam análise biológica dos tumores tão acurada quanto aquela baseada em microarranjos de cDNA, alternativamente, é possível utilizar esta ferramenta para identificar grupos conforme o perfil de expressão de marcadores (ABD EL-REHIM et al., 2005).

O *St. Gallen International Breast Cancer Conference Expert Panel* congrega especialistas para discutir e apresentar estudos relevantes em câncer de mama. Na 12ª edição do evento que ocorreu em 2011 a classificação dos subtipos de câncer da mama realizada através da imuno-histoquímica e da hibridização fluorescente *in situ* (FISH) foi adotada para as deliberações sobre estratégias terapêuticas. Nessa conferência foi recomendado o uso do receptor de estrógeno (RE), do receptor de progesterona (RP), do receptor do fator de crescimento epidérmico humano (HER-2) e do Ki-67 para a classificação dos subtipos: Luminal A - RE e/ou RP positivos, HER-2 negativo e Ki-67 baixo (<14%); Luminal B HER2 negativo - RE e/ou RP positivos, HER2 negativo e Ki-67 alto (≥14%); Luminal B HER2 positivo - RE e/ou RP positivos e HER-2 positivo; HER-2 superexpresso (não luminal), RE e RP negativos e HER-2 positivo; Triplo-negativo: ausência de expressão de RE, RP e HER-2 (Tabela 3).

No *13th St. Gallen International Breast Cancer Conference Expert Panel*, 2013 a classificação foi modificada com base na avaliação semiquantitativa da expressão dos RP na evolução clínica e a resposta ao tratamento. A proporção de células que expressa os genes e a proteína RP nos tumores luminais A foi avaliado e a fraca positividade dos RP (<20%) foi associada com pior prognóstico e passou a ser considerado um marcador para luminal B (PRAT et al., 2013). Os luminais B foram dicotomizados em dois grupos, os luminais B-HER-2 positivos (RE positivo e HER-2 superexpresso ou amplificado, independentemente dos resultados quanto a Ki-67 e RP) e os luminais B-HER-2 negativos (RE positivos, HER-2 negativos e um dos seguintes: Ki-67 elevado ou RP negativo ou baixo). Os tumores de subtipo HER-2 são definidos pela superexpressão de HER-2 e ausência de RP e RE. Os triplo

negativos continuaram sendo definidos pela ausência de RE, RP e HER-2, conforme classificação anterior (Tabela 3).

Tabela 3- Classificação dos subtipos moleculares carcinomas invasivos da mama mulheres segundo a classificação de *St. Gallen* 2011 e 2013 (Adaptado de SERRA et al., 2014).

Subtipo molecular	<i>St. Gallen 2011</i>	<i>St. Gallen 2013</i>
Luminal A	RE e/ou RP+, Ki-67 <14%	RE +, RP + > ou igual a 20% e Ki-67 <14%
Luminal B HER-2 -	RE e/ou RP+, Ki-67>14% HER2 -	RE/RP + 14%, HER2 -
Luminal B HER-2 +	RE +, HER2+, qualquer valor de Ki-67 e de RP	RE +, HER-2 +, qualquer valor de Ki-67 e de RP
HER2	RE e RP-, HER2+	RE e RP-, HER2+
Triplo negativo	RE e RP-, HER2 -	RE e RP-, HER2 -

2.5. Classificação molecular do câncer de mama em cadelas

A classificação molecular para tumores mamários caninos tem sido motivo de interesse para diversos investigadores que buscam conhecer melhor a biologia tumoral e o prognóstico das NMC. GAMA et al., (2008) foram os pioneiros a identificar os subtipos fenotípicos em NMC e analisar possíveis implicações clínicas desta classificação. Esses autores utilizaram cinco marcadores imuno-histoquímicos: RE, HER2, CK5, p63 e P-caderina e os resultados permitiram a classificação de quatro subtipos: Luminal A, luminal B, Basal e o subtipo HER-2 e 4,2% dos casos não apresentaram imunoreatividade para nenhum dos marcadores testados (fenótipo Nulo ou Negativo). Os autores verificaram associação significativa entre o subtipo Luminal A e baixo grau histológico (grau I e II), baixo índice de proliferação celular e carcinomas complexos. Os subtipos Basal-like e HER2+ foram mais frequentes entre os carcinomas simples e carcinossarcomas. Basal-like apresentou alta frequência de neoplasias de alto grau histológico, alto índice de proliferação e pior prognóstico com menor tempo de sobrevivência em relação aos luminais. O subtipo HER-2 superexpresso foi associado com lesões maiores, com alto grau histológico e índice de proliferação elevado, contudo

apresentaram uma evolução clínica mais favorável, contrapondo os resultados descritos na mulher. Os autores justificam esses dados discrepantes pelo baixo número de casos identificados como HER-2 positivos.

Subsequentemente, foi verificada a correlação entre os subtipos moleculares com o grau de invasão e o grau histológico em um estudo que definiu os subtipos moleculares: Luminal A (RE ou RP +, HER-2-), Luminal B (RE ou RP+, HER-2+), HER2 positivo (RE ou RP -, HER-2+), Basal (RE, RP e HER-2-, CK5/6 ou CK14 +) e Não classificado ou Normal (todos os marcadores negativos), utilizando um painel com cinco marcadores: RE, RP, HER-2, CK14 e CK5/6 (SASSI et al., 2010). Esses autores verificaram que o subtipo luminal A foi correlacionado com baixo grau histológico e o luminal B aos graus II e III. Na análise de sobrevivência não houve diferença significativa entre os diferentes subtipos moleculares verificando-se, no entanto, melhores desfechos clínicos nos animais com tumores mamários do subtipo Basal em relação aos subtipos Luminais. Diferente de Gama et al (2008), não foram encontradas neoplasias HER-2-positivo, tendo os autores justificado o fato pelo pouco número de casos avaliados (45 casos) ou estar relacionado com características epidemiológicas da população.

RIBEIRO et al. (2012) investigaram os aspectos morfológicos e imunofenotípicos em tumores mamários caninos definindo os subtipos: luminal A, luminal B, HER2 superexpresso, basal e normal. O componente carcinomatoso invasivo mostrou com maior frequência o subtipo luminal A (12/29 casos, 41,4%), seguido do fenótipo basal (8/29 casos, 27,6%). Apesar de realizar a classificação imunofenotípica somente em carcinomas em tumores mistos, o painel de marcadores adotado pelos investigadores foi o primeiro a incluir juntamente com CK5 o receptor do fator de crescimento epidérmico humano 1 (EGFR) para a classificação do fenótipo basal.

A relação entre a classificação molecular do tumor mamário primário e sua metástase nodal foi analisada por BEHA et al. (2012). O painel de estudo desses autores, além de avaliar RE, RP e HER2 incluiu uma variação nos marcadores basais: citoqueratinas 5/6, citoqueratina 14 (CK14), citoqueratina 19 (CK19) e proteína 63 (p63). Na comparação de NMC primárias e suas metástases verificou-se que quatro fenótipos foram detectados nos tumores primários: luminal A, luminal B, HER2 superexpresso e basal-like. Já nas metástases linfonodais foram encontrados cinco (luminal A, luminal B, HER2 superexpresso e basal-like). A concordância

fenotípica foi encontrada em 13 dos 20 casos (65%) e sete casos (35%) mostraram discordância com o perfil fenotípico dos linfonodos em relação ao tumor primário. Os autores concluíram que o fenótipo do tumor primário assume um papel preditivo apenas nos casos concordantes com a sua metástase nodal e indicaram que a avaliação do tumor primário e da metástase nodal seja avaliada ao mesmo tempo. Ressaltando ainda que um plano de tratamento baseado apenas no fenótipo primário do tumor pode levar a falhas terapêuticas se o fenótipo da metástase nodal for diferente do tumor primário (BEHA et al., 2012).

Em outro estudo, neoplasias mamárias caninas foram classificadas em triplo negativo e não triplo negativo com o objetivo de avaliar a distinção entre os subtipos Basal-like e Triplo negativo. KIM et al. (2013) verificaram que entre as neoplasias triplo negativas, 91,1% eram do subtipo Basal-like e 8,9% mama normal. Resultado semelhante foi descrito na mulher (CHEANG et al., 2008). IM et al. (2014) verificaram que neoplasias Luminais A foram associadas aos carcinomas simples tubulares, aos carcinomas complexos e aos carcinomas em tumores benignos mistos e os Basais associados aos carcinomas sólidos. As neoplasias com subtipo Luminal A foram frequentemente de graus I e II e as Basais, comumente de grau III. Em 51% dos tumores do subtipo Basal havia invasão linfática.

Recentemente, investigadores incluíram o índice de proliferação celular (Ki67), juntamente com os marcadores RE, RP, HER2, CK5/6 e EGFR para obtenção dos imunofenótipos em carcinomas mamários caninos (ABADIE et al., 2017). Esses autores utilizaram dois sistemas de classificação, um deles seguiu os critérios de NIELSEN et al (2004) obtendo os subtipos: luminal A 14,3%, luminal B 9,4%, triplo-negativo basal-like 58,6%, e triplo-negativo tipo não-basal 17,7%; a outra classificação foi de acordo com BLOWS et al. (2010) resultando nos imunofenótipos: Luminal 1: 11,4%, Luminal 1+: 12,3%, Fenótipo basal: 58,6% e Fenótipo negativo: 17,7%. Os autores não descrevem casos HER2+ , assim como verificado por SASSI et al. (2010), porém a proporção de neoplasias triplo-negativas (76%) foi muito superior em relação às neoplasias luminais, contrapondo os resultados dos estudos anteriores (GAMA et al., 2008, SASSI et al., 2010, RIBEIRO et al., 2012). Conforme exposto, desde 2008 diversos investigadores veem adotando a classificação molecular para tumores mamários caninos. Contudo, não há padronização na definição dos painéis imunohistoquímicos. A tabela 4 apresenta os painéis de classificação empregadas nos diversos estudos de imunofenótipos para tumores mamários caninos.

Tabela 4 - Sistema de classificação molecular para tumores mamários caninos de acordo com estudos realizados de 2008 a 2017

Autores e Ano de publicação	Luminal A	Luminal B	HER2	Triplo negativo
Gama et al., 2008	RE+, HER2-, P63 e CK5 -/+	RE+, HER2+, P63 e CK5 -/+	RE-, HER2+P63 e CK5 -/+	RE-, HER2 -, P63 e CK5 +
Sassi et al., 2010	RE ou RP+, HE2-	RE ou RP+, HER2+	RE e RP-, HER2+	RE e RP-, HER2-, CK5/6 ou CK14 +
Ribeiro et al., 2012	RE ou RP+, HE2-	RE ou RP+, HER2+	RE e RP-, HER2+	RE e RP-, HER2-, CK5/6 ou EGFR+
Beha et al., 2012	RE ou RP+, HE2-	RE ou RP+, HER2+	RE e RP-, HER2+	RE e RP-, HER2-, CK5/6 e/ou CK14 e/ou p63 +
Abadie et al., 2017	RE ou RP+, HER2-, Ki67<33%	RE ou RP+, HER2-, Ki67>33%	RE e RP-, HER2+	RE e RP-, HER2-, CK5/6 ou EGFR +

Além da divergência na definição dos diversos marcadores imuno-histoquímicos, os estudos de imunofenótipo em NMC ainda apresentam discrepâncias quanto às metodologias aplicadas para a avaliação da expressão imuno-histoquímica (Tabela 5). O primeiro estudo não inclui a avaliação de RP e os autores consideraram positividade para RE a presença de >10% de marcação nuclear em células neoplásicas (GAMA et al., 2008). O mesmo critério de positividade de RE e RP foi adotado em estudos posteriores (KIM et al., 2013; ABADIE et al., 2017), porém um escore de positividade >5% de células marcadas foi empregado por outros autores (SASSI et al., 2010; RIBEIRO et al., 2012; BEHA et al., 2012).

Segundo os guias de recomendações do teste do HER2 em câncer de mama na mulher, feito pela Sociedade Americana de Oncologia Clínica (*American Society of Clinical Oncology-ASCO*) e Colégio de Patologistas Americanos (*College of American Pathologists-CAP*) em 2007 e 2013, as técnicas de ISH (Hibridização *in situ*) ou FISH (Hibridação fluorescente *in situ*) devem ser utilizadas nos casos considerados equívocos (2+) (WOLFF, et al., 2007;

WOLFF, *et al.*, 2013). Em medicina veterinária, somente um estudo seguiu essas recomendações (ABADIE *et al.*, 2017), casos equívocos (2+) foram considerados positivos nos demais estudos de imunofenótipos (GAMA *et al.*, 2008; SASSI *et al.*, 2020; RIBEIRO *et al.*, 2012; BEHA *et al.*, 2012). Portanto, a maior discrepância entre os estudos de imunofenótipos em NMC está relacionada aos critérios de avaliação dos marcadores (Tabela 5).

Tabela 5- Critérios de determinação da positividade dos marcadores imuno-histoquímicos para classificação molecular de neoplasias mamárias de cadelas.

Marcador imuno-histoquímico	Gama et al., 2008	Sassi et al., 2010	Ribeiro et al., 2012	Beha et al., 2012	Kim et al., 2013	Abadie et al., 2017
Receptor hormonal	RE >10%	RE/RP 5%	RE/RP >5%	RE/RP >5%	RE/RP>10%	RE/RP>10%
Índice de proliferação	-	-	-	-	-	ki67>33%
HER2	2+ e 3+	2+ e 3+	2+ e 3+	2+ e 3+	3+	2+ e 3+
Marcadores basais	CK5 e P caderina >50%	CK5/6 e CK14 pelo menos 1%	CK5 fraca ou forte; EGFR>10%	CK5/6, CK14 e CK19 >1%;	CK5/6, CK14, EGFR >5%	CK5/6 e EGFR >10%

2.6. Tratamento

A ressecção cirúrgica é considerada o padrão de tratamento para cadelas com neoplasias mamárias, exceto em casos de carcinoma inflamatório (SORENMO, 2003; SORENMO *et al.*, 2013). A remoção cirúrgica permite o diagnóstico histológico, melhora a qualidade de vida, interfere com a progressão da doença e em casos de tipos histológicos de bom prognóstico e em estadió inicial pode ser curativa (QUEIROGA & LOPES, 2002, CASSALI *et al.*, 2014). A extensão da cirurgia depende da evolução da doença, da drenagem linfática, do tamanho e localização da lesão (SORENMO, 2003; CASSALI *et al.*, 2014).

A nodulectomia deve ser considerada para a remoção de lesões pequenas (0,5cm) e não aderidas. Lesões maiores implicam na necessidade de remover toda a glândula, podendo ser realizada a mastectomia simples, indicada para lesões de até três centímetros, acometendo apenas uma glândula sendo a lesão centralizada na mama, não aderida, sem inflamação e o planejamento cirúrgico podendo respeitar as margens de 2.0 cm de segurança; enquanto a mastectomia regional ou a ressecção em bloco é indicada para a remoção de conexões linfáticas de glândulas acometidas por lesões centralizadas, (BRODEY et al., 1983; SORENMO et al., 2013; CASSALI et al., 2014). A mastectomia radical consiste na remoção de uma cadeia mamária unilateral, quando lesões maiores que três centímetros afetam a glândula abdominal cranial. As mastectomias regionais e radicais também podem ser realizadas em pacientes com lesões múltiplas, para obter uma única ferida cirúrgica através de uma única incisão e ressecção do tecido mamário (HORTA et al., 2014).

As altas taxas de recorrências e mortalidade em pacientes com doença metastática ou com neoplasias mamárias de prognóstico desfavorável indicam a necessidade de tratamentos adicionais como quimioterapia, utilização de inibidores de ciclooxigenase e quimioterapia metronômica. Quimioterapia é frequentemente administrada em cadelas com neoplasias mamárias de tipos histológicos agressivos ou com estadio clínico avançado (SOENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013, CASSALI et al., 2011; CASSALI et al., 2014). Carcinoma micropapilar, carcinoma sólido, carcinoma tubular grau III e carcinossarcoma são considerados tipos histológicos agressivos havendo a necessidade de complementação terapêutica.

A expressão de COX-2 está relacionada à progressão tumoral e representa um valor preditivo em potencial, tendo em vista a possibilidade da associação de inibidores seletivos da COX-2, como o firocoxib, em tratamentos adjuvantes (CASSALI et al., 2011; LAVALLE et al., 2012). LAVALLE et al. (2012) descreveram um aumento na taxa de sobrevida em cadelas tratadas com carboplatina com ou sem a associação de inibidores de Cox-2 quando comparado às cadelas tratadas apenas com cirúrgica. KARAYANNOPOULOU et al. (2001) relataram um aumento de sobrevida livre de doença e global em cadelas tratadas com cirurgia e com 5-fluoracil e ciclofosfamida quando comparado às cadelas tratadas apenas com cirurgia. Entretanto, não existe uma recomendação padrão para o uso da quimioterapia (CASSALI et al., 2014). A literatura descreve os seguintes protocolos: doxorubicina

associado a ciclofosfamida, doxorrubicina associado a carboplatina, carboplatina associado a gencitabina e paclitaxel como único fármaco (CASSALI et al., 2014).

A inibição dos receptores de estrógeno, por meio de fármacos anti-estrogênicos, como o tamoxifeno, pode promover efeitos colaterais graves em cadelas, devido ao seu efeito agonista em outros tecidos ou órgãos, como por exemplo, no útero, aumentando o risco do desenvolvimento de piometra (TAVARES et al., 2010), contudo a ovariectomia, pode influenciar na sobrevivência dos pacientes com neoplasias mamárias que expressam receptores hormonais (SORENMO, 2003). No câncer de mama humano o anticorpo monoclonal trastuzumab está associado a um maior intervalo livre de doença em mulheres com tumores HER2 superexpresso. Entretanto o alto custo comercial desse anticorpo e a ausência de ensaios clínicos em cadelas impossibilitam, até o momento, a recomendação desse tratamento para cadelas com neoplasias HER2 positivo.

3. JUSTIFICATIVA

A partir do exposto, observa-se que os estudos de imunofenótipo em NMC mostram discrepâncias quanto à escolha do painel imuno-histoquímico e critérios para determinação da positividade para os marcadores. Além disso, os resultados são divergentes em relação a frequência de distribuição e o prognóstico dos imunofenótipos. Diante desse cenário, é relevante a avaliação de um sistema já padronizado para estratificar as neoplasias, conforme tem sido feito na medicina humana. Além disso, outro passo importante para a compreensão do prognóstico seria a avaliação da expressão coordenada de Cox-2, RE, RP e KI67. O valor prognóstico da expressão dessas proteínas já foi descrito em neoplasias mamárias caninas, porém estudos da associação entre esses marcadores e sua relação com a resposta terapêutica ainda são extremamente escassos.

4. HIPÓTESE

O emprego do Sistema *St Gallen*, preconizado na medicina humana, pode definir os imunofenótipos, tendo em vista que ele ainda não foi empregado para a classificação molecular das neoplasias mamárias caninas.

A avaliação da expressão coordenada de RE, RP, Ki67 e COX2 apresenta relação com o prognóstico e a resposta terapêutica.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo geral

Caracterizar as neoplasias mamárias caninas quanto ao imunofenótipo e verificar se há relação com características clínico-patológicas, fatores prognósticos, protocolos terapêuticos e sobrevida.

5.2. Objetivos específicos

Avaliar a imunomarcção para receptor de estrógeno, receptor de progesterona, receptor de crescimento epidérmico humano tipo (HER1 e HER2) e citoqueratinas 5/6 para classificação dos fenótipos moleculares das neoplasias mamárias caninas;

Verificar se o fenótipo molecular das neoplasias mamárias caninas está relacionado com fatores os clínico-patológicos. Verificar se o fenótipo molecular das neoplasias mamárias caninas influencia na resposta clínica das cadelas submetidas a diferentes abordagens terapêuticas;

Verificar se a expressão de marcadores prognósticos (RE, RP, COX2 e Ki-67) influencia no tempo de sobrevida de cadelas diagnosticadas com neoplasias mamárias caninas;

Verificar se a expressão de marcadores prognósticos (RE, RP, COX2 e Ki-67) influencia na resposta clínica das cadelas submetidas a diferentes abordagens terapêuticas.

6. METODOLOGIA

6.1. Comitê de ética

O trabalho foi realizado segundo as recomendações e a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG), sob o número de protocolo 366/2016 (ANEXO I).

6.2. População

Foram incluídas no estudo cadelas com neoplasias de glândulas mamárias atendidas e submetidas à exérese cirúrgica pelo Setor de Oncologia no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais. O diagnóstico definitivo foi realizado pelo Laboratório de Patologia Comparada do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG.

Os dados clínico-patológicos foram obtidos dos prontuários de atendimento, dos laudos histopatológicos e/ou acompanhamento clínico das pacientes. As informações coletadas possibilitaram gerar um banco de dados de cadelas atendidas de 2000 a 2016. As variáveis clínico-patológicas coletadas foram: idade ao diagnóstico, status reprodutivo, ciclo estral, pseudociese, uso de contraceptivos, tamanho tumoral, presença de metástases regionais ou distantes, estágio clínico, tipo e grau histológico e invasão linfática.

6.3. Estadiamento clínico

Todas as pacientes foram submetidas à estadiamento clínico para avaliação da evolução da doença. O estadiamento foi realizado de acordo com uma versão modificada do sistema TNM original estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (adaptado de SORENMO et al., 2013). Esse sistema considera o tamanho do tumor primário (T), envolvimento de linfonodos regionais (N) e evidências de metástases em órgãos distantes e/ou linfonodos não associados com a drenagem da cadeia mamária. O estadiamento clínico permite classificar as cadelas com tumores mamários em cinco estádios de I-V, conforme descrito anteriormente na tabela 2.

A confirmação de metástases nodais foi realizada através de análise em hematoxilina e eosina (H&E) considerando-se como linfonodos positivos a presença de células isoladas, micro ou macrometástases em linfonodos inguinais e/ou axilares. Para pesquisa de metástases em órgãos distantes, todas as cadelas foram submetidas a exames complementares de imagem como ultrassom abdominal e radiografias torácicas em três incidências (VD- ventro dorsal, LLD- latero lateral direita e LLE- latero lateral esquerda) no momento do diagnóstico do tumor de mama e a cada três meses até completar dois anos de pós-cirurgia.

6.4. Histopatologia

Foram obtidas secções histológicas de 4 µm do tumor primário, previamente fixadas durante 24 horas em formol neutro e tamponado a 10%, processadas pela técnica rotineira de inclusão em parafina e coradas pela técnica da hematoxilina e eosina (H&E). Os tipos histológicos das neoplasias mamárias malignas foram classificados de acordo com o *Consensus for the*

Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors (CASSALI et al., 2011; 2014).

6.5. Grau histológico

As NMC foram graduadas pelo sistema de Nottingham (Elston e Ellis, 1998). Este sistema considera formação tubular (>75%: 1 ponto; entre 10% e 75%: 2 pontos; ≤10%: 3 pontos), pleomorfismo nuclear (núcleos pequenos, regulares e cromatina nuclear uniforme: 1 ponto; aumentos moderados no tamanho e variabilidade nucleares: 2 pontos; células exibindo acentuado pleomorfismo, grande variação no tamanho e forma dos núcleos, núcleos bizarros, vesiculosos e com múltiplos nucléolos: 3 pontos) e contagem mitótica (de 0 – 8 mitoses: 1 ponto; 9 – 16 mitoses: 2 pontos e acima de 17 mitoses: 3 pontos). Foi utilizado o microscópio BX-41 com ocular de 10x e objetiva de 40x para a avaliação do índice mitótico, contadas em 10 campos de grande aumento (CGA) (ELSTON& ELLIS, 1998).

Para a obtenção do grau histológico do tumor, o escore para cada fator foi somado, resultando em um valor total que varia de 3 a 9. O grau tumoral foi alocado baseado nos valores a seguir: 3–5 pontos: grau I; 6 – 7 pontos: grau II; 8 – 9 pontos: grau III.

6.6. Imuno-histoquímica

Secções histológicas consecutivas de 4µm foram preparadas, as quais foram desparafinizadas em xilol e álcool, em seguida reidratadas em uma série de alcoóis progressivamente diluídos. As reações de imuno-histoquímicas foram realizadas pelo método do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase com um sistema comercial de detecção de anti-rato/anti-coelho (Novolink Polymer Detection Sistem; Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, Reino Unido) de acordo com as instruções do fabricante. A recuperação antigênica para RE, RP, Ki67, COX2 e HER2 foi realizada em calor-úmido pressurizado (Pascal®) com citrato pH 6,0 (DakoCytomation Target Retrieval Solution). Para a CK 5/6, a recuperação foi realizada em calor-úmido pressurizado (Pascal®) com tampão de recuperação Trilogy® (Cell Marque). Para o EGFR, a recuperação antigênica enzimática, com pepsina, ocorreu em estufa a 37°C. Os anticorpos primários estão listados na tabela 6. Todas as secções foram incubadas com o anticorpo primário específico durante 16h em câmara úmida a 4°C. A imunorreatividade foi visualizada com o cromógeno diaminobenzidina (DAB Substrate System, Dako, Carpinteria,

CA, EUA) e contra-corado com hematoxilina de Mayers. Secções de neoplasias mamárias de mulheres com positividade previamente confirmada para RE, RP, Ki67, COX2, HER-2, EGFR e CK 5/6 foram utilizadas como controles positivos em cada reação. Para os controles negativos o anticorpo primário foi substituído por solução salina tamponada com fosfato (PBS).

Tabela 6 - Anticorpos primários utilizados nas reações de imuno-histoquímica

Anticorpo	Fabricante	Clone	Diluição	Marcação	Referência
RE	Dako	1D5	1:50	Nuclear	Hammond et al., 2010
RP	Neomarkers	hPRa2	1:50	Nuclear	Hammond et al., 2010
HER-2	Dako	Policlonal	1:200	Membranar	Wolf et al., 2013
Ki-67	Dako	MIB-1	1:50	Nuclear	Dutra et al., 2008
EGFR	Invitrogen	31G7	1:50	Membranar	Wolf et al., 2013
CK5/6	Dako	D5/16/B4	1:50	Citoplasmática	Kim et al., 2013
COX2	Thermo	SP21	1:80	Citoplasmática	Lavalle et al., 2012

6.7. Quantificação da imunorreatividade

O índice de proliferação celular (Ki67) e a marcação para RE e RP foram calculados pela contagem manual do número de núcleos positivos em um total de 500 células neoplásicas em áreas de imagem de melhor marcação (*hot spot/zonas quentes*) por meio de análise manual de imagens no software *Image J* (*National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA*). Foram considerados positivos para RE e RP os casos em que > 10% das células neoplásicas foram marcadas. A possível relação entre os escores de 10, 15 e 20% para Ki67 e intervalo livre de doença (DFI), sobrevida específica (SS) e sobrevida global (OS) foi testada e somente o escore >20% foi associado com menor DFI, menor SS e menor OS e por isso esse valor foi utilizado como ponto de corte para classificar os casos com alto e baixo índice de proliferação.

A expressão de HER2 foi determinada pelo sistema de escore semiquantitativo estabelecido pela *American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists*

(ASCO/CAP) (Wolff *et al.*, 2013), conforme descrito na tabela 7. A avaliação da expressão para citoqueratina CK5/6 foi qualitativa e foi considerada como positiva a marcação citoplasmática das células neoplásicas. A expressão do EGFR foi avaliada por meio de critérios adaptados da avaliação do HER-2, que considera que espécimes com pontuações de 0, 1+ e 2+ sejam considerados negativos e os com pontuação de 3+ como positivos (Wolff *et al.*, 2013).

Tabela 7 - Interpretação imuno-histoquímica para EGFR e HER2 proposto pela Associação Americana de Oncologia e o Colégio Americano de Patologistas (WOLFF *et al.*,2013)

Escore	Interpretação	Descrição microscópica
0	Negativo	Ausência de marcação ou marcação membranar fraca e incompleta em $\leq 10\%$ das células tumorais.
1+	Negativo	Marcação membranar fraca e incompleta em $> 10\%$ das células tumorais.
2+	Equívoco	Marcação membranar incompleta e/ou fraca/moderada em $> 10\%$ das células tumorais ou marcação membranar forte e completa em $\leq 10\%$ das células tumorais.
3+++	Positivo	Marcação membranar forte e completa em $> 10\%$ das células tumorais.

6.8. Imunofenótipo

Foi considerada uma classificação semelhante à proposta pelo Consenso de *St. Gallen* (2013), a qual estratifica os tumores em luminais, HER2 superexpresso e triplo-negativo. Os luminais são subdivididos em: luminal A, luminal B-HER2 negativo e luminal B-HER2 positivo, levando em consideração o ponto de corte para o índice de proliferação celular (Ki67). No presente estudo, foi considerado o valor $\geq 20\%$ para classificar os casos com alto índice de proliferação celular. O subtipo HER2 superexpresso foi caracterizado pela ausência de expressão de marcação para receptores hormonais (RE e RP) e positividade para HER2. Os casos triplo-negativos foram assim considerados devido a ausência de positividade para RE, RP e HER2, sendo classificados como basais os casos onde houve positividade para CK5/6

e/ou EGFR. Os critérios adotados para a definição do perfil imuno-histoquímico estão descritos na tabela 8.

Tabela 8 - Classificação imuno-histoquímica em subtipos de neoplasias mamárias caninas

Anticorpos	Luminal A	Luminal B		HER-2 superxpresso	Triplo Negativo	
		HER-2 -	HER-2 +		Basal-like	Não Basal-like
RE ou RP	+	+	+	-	-	-
Ki-67	< 20%	> 20%	NS	NS	NS	NS
HER-2	-	-	+	+	-	-
CK5/6	indiferente	indiferente	indiferente	indiferente	+	-
EGFR	indiferente	indiferente	indiferente	indiferente	+	-

NS: não significativo

6.9. Acompanhamento

O acompanhamento foi realizado por monitoramento dos retornos periódicos das pacientes ao Hospital Veterinário da UFMG e do contato com os proprietários por meio de ligações telefônicas. Os retornos periódicos ocorreram a cada três meses no primeiro ano após a mastectomia e a cada seis meses até completar dois anos de acompanhamento. Exame clínico geral, específico e exames complementares de imagem (Radiografia e ultrassom abdominal) e hematológicos (hemograma, coagulograma e função renal e hepática) foram realizados em todas as pacientes para investigação de metástases em órgãos distantes e avaliação clínica geral.

Todas as pacientes foram acompanhadas por um período mínimo de 2 anos (24 meses) e o tempo máximo de seguimento foi de 5,8 anos para avaliar o intervalo livre de doença (DFI), definido com intervalo de tempo desde a mastectomia até a primeira recidiva local ou linfonodo e/ou metástase à distância. A sobrevivência específica (SS) foi definida como o tempo, em dias, entre a mastectomia e a morte causada pela progressão da doença e sobrevivência global (OS) foi definida como o período, em dias, entre a mastectomia e morte por qualquer causa. Todos os pacientes sobreviventes ao final do acompanhamento foram censurados na última data registrada nos prontuários médicos. Os pacientes perdidos para acompanhamento foram analisados até a data do último registro. Pacientes que morreram de causas não

relacionadas ao câncer de mama foram censurados na data da morte. O tempo de início da observação para cada indivíduo (T_0) foi definido como a data da cirurgia de remoção do tumor mamário. Os pacientes foram acompanhados até dezembro de 2018.

6.10. Tratamento

Todas as cadelas foram submetidas a cirurgia como terapia inicial sendo realizada nodulectomias, mastectomia simples, em bloco ou radical unilateral. A escolha da técnica cirúrgica para cada paciente foi de acordo com as diretrizes de mastectomia para tumores mamários considerando o número de lesões, tamanho, localização e drenagem linfática, respeitando-se os princípios de cirurgia oncológica como margens cirúrgicas (HORTA et al., 2014).

Quimioterapia adjuvante foi recomendada para todas as pacientes com estágio avançado (IV-V) ou diagnosticadas com tipos histológicos agressivos como carcinoma lobular pleomórfico, micropapilar, sólido e carcinossarcoma. O protocolo consistiu em quatro sessões de carboplatina, por via intravenosa, na dose de $300\text{mg}/\text{m}^2$ a cada 21 dias. Quimioterapia metronômica foi realizada com ciclofosfamida na dose de $15\text{mg}/\text{m}^2$ e firocoxibe na dose de $5\text{mg}/\text{kg}$ por via oral a cada 24h durante seis meses ou ininterruptamente em pacientes com metástases distantes.

Todos os tutores foram informados sobre o prognóstico e em casos com indicação foi recomendada terapia adjuvante. O grupo formado por cadelas tratadas exclusivamente por cirurgia foi assim formado devido à recusa dos tutores em aderir a quimioterapia adjuvante.

6.11. Análise estatística

A avaliação de associações entre os grupos e as variáveis clínico-patológicas (idade, status reprodutivo, pseudociese, ciclo estral, tamanho tumoral, estadió clínico, invasão angiolímfática, tipo e grau histológico) foi realizada através do teste de Qui-quadrado ou exato de Fisher. As variáveis contínuas foram avaliadas através do teste t de Student.

O valor prognóstico das diferentes variáveis clínico-patológicas foi determinado por meio de análise univariada de sobrevida específica (SS), sobrevida global (SG) e tempo livre de doença (TLD). Para evitar interferência do tratamento, todas as análises de cada variável em relação ao tempo de sobrevida foram realizadas com pacientes tratadas exclusivamente por cirurgia. As curvas de sobrevida (SS, SG e TLD) foram estimadas pela curva de Kaplan-Meier e as comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste de log-rank de Cox Mantel. Foram consideradas como significativas às associações e concordâncias cuja probabilidade de significância do teste foi $p < 0,05$.

As razões de riscos (HR) foram estimadas pelo modelo de regressão de Cox considerando como variável dependente o tempo de sobrevida específica, global ou tempo livre de doença. As variáveis foram categorizadas em duas classes para possibilitar a análise de regressão multivariada. Primeiramente foi realizada análise univariada de sobrevida de Kaplan-Meier para selecionar quais variáveis tiveram associações significativas com o evento óbito. O resultado da análise univariada permitiu determinar o risco relativo de óbito, com um intervalo de confiança de 95%. A análise multivariada foi realizada somente com as variáveis que apresentaram valor de $P < 0,50$ na análise univariada. Após esse passo, todas as variáveis que apresentavam $P < 0,50$ foram analisadas em conjunto. No modelo final, permaneceram aquelas que apresentaram valor de $P < 0,05$. Finalmente, realizou-se a análise de resíduos de Schoenfeld para estimar o ajuste do modelo final. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software Stata, versão 14.0.

7. RESULTADOS

Os resultados serão apresentados sob a forma de dois artigos científicos elaborados durante o período de doutoramento. O artigo 1 foi submetido para publicação ao periódico *The Veterinary Journal*

Artigo 1 - Immunophenotypes of canine mammary cancer: clinical-pathological characteristics and survival

Artigo 2 - Expressão de ER, PR, Ki67 e COX-2 definem diferentes grupos com impacto no tratamento e na sobrevida específica em neoplasias mamárias caninas agressivas

ARTIGO 1

Immunophenotypes of canine mammary cancer: clinicopathological characteristics and survival

Fernanda Camargo Nunes^a, Tatiany Luiza Silveira^a, Angélica Cavalheiro Bertagnolli^b, Débora Balabram^c, Gleidice Eunice Lavalle^d, Geovanni Dantas Cassali^{a*}

^a Laboratory of Comparative Pathology, Department of General Pathology, Biological Science Institute (ICB), Department of General Pathology, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil

^b Histopathology Laboratory, Desidério Finamor Veterinary Research Institute, Department of Agriculture, Livestock and Rural Development, Diagnostic and Agricultural Research Department, Eldorado do Sul, Brazil

^c Breast Cancer Specialist, Assistant Doctor and Scholarship holder of the Graduate Studies and Research Center, Santa Casa de Belo Horizonte, Belo Horizonte, Brazil

^d Veterinary Hospital, Veterinary School, Department of Veterinary Clinic and Surgery, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil

Corresponding author: E-mail address: cassalig@icb.ufmg.br (G. D. Cassali)

Abstract

Canine mammary cancers exhibit great variability in their biological behavior, and the study of immunophenotypes is important to better determine their prognosis. The aim of this study was to determine the immunophenotypes of canine mammary cancers according to the panel recommended by the St. Gallen Consensus (2011;2013) and to associate the immunophenotypes with clinicopathological parameters and survival. The mammary cancers were classified as follows: 32% luminal A, 51% luminal B HER2-, 5% luminal B HER2+ and 12% triple-negative. The association between clinical factors and subtype showing a lower percentage of patients in clinical stage IV-V ($P=0.040$) for the luminal A subtype and a greater frequency of angiolymphatic invasion in luminal B HER2+ ($P=0.015$). The luminal A subtype was associated with a higher frequency of carcinomas in mixed tumors (42%), and luminal B HER2- was associated with solid (31%) and micropapillary (21%) carcinomas. Histological grade III occurred more frequently in the luminal B HER2+ and triple-negative subtypes ($P<0.001$). In the Cox regression analysis the luminal B HER2+ (SS: HR=3.30, $P=0.018$; OS: HR=3.22, $P=0.004$) presented a higher risk of death compared to luminal A. Luminal A had a longer survival and disease-free interval compared to the other immunophenotypes (DFI: $P=0.0249$; SS: $P=0.0402$; OS: $P=0.0221$). The current study shows that the different immunophenotypes of canine mammary cancers have implications for the prognosis. This is the first study to subdivide the luminal subtypes in: luminal A, luminal B HER2- and luminal B HER2 +. The luminal A subtype was associated with a better prognosis.

Keywords: Carcinoma; mammary; luminal; triple-negative

Introduction

The biggest challenge in determining prognosis is related to the heterogeneity of human breast cancer, as neoplasms with similar histological types, clinical stage and degree of differentiation may have different prognoses and therapeutic responses (Reis-Filho et al., 2006). For this reason, different technologies have been used to stratify neoplasms according to molecular similarities. By evaluating gene expression based on technologies such as DNA microarrays, it is possible to stratify human breast cancer into the following molecular subtypes: luminal A, luminal B/human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) - negative, luminal B/HER2-positive, HER2-positive (non-luminal) and basal-like (Perou et al., 2000; Rakha et al., 2008; Goldshirsch et al., 2013).

Due to the difficulty of applying techniques such as DNA microarrays in the laboratory, immunohistochemical panels have been proposed to identify these molecular subtypes in human breast cancer (Nielsen et al., 2004, Blows et al., 2010, Goldshirsch et al., 2013). The immunohistochemical markers that best define the immunophenotypes of human breast cancer were recommended in the St. Gallen International Breast Cancer Consensus Conference (Goldshirsch et al., 2011, 2013) and is based on the evaluation of estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) status, overexpression of human epidermal growth factor receptor (HER2) and cell proliferation index (Ki67), important in the distinction between 'Luminal A' and 'Luminal B (HER2 negative)' subtypes. CK5 / 6 and EGFR markers are also used for classification of basal subtypes.

Similar to humans, canine mammary cancers also represent a heterogeneous group in terms of morphology and biological behavior (Gama et al., 2008). Molecular classification has been applied in veterinary medicine due to the great interest of the researchers to know better the biology of the tumor and the prognosis of canine mammary cancer (CMC). Gama et al. (2008) were pioneers in the classification and analysis of possible clinical implications of the immunophenotypes of CMC. The further studies present variations in the immunohistochemical panel used to determine the profiles of immunophenotypes, and in the criteria for determining the positivity of the markers (Gama et al., 2008; Sassi et al., 2010; Abadie et al., 2017). In addition, some studies have reported a higher frequency of luminal

neoplasms, while others have observed a higher occurrence of the triple-negative subtype (Gama et al., 2008; Sassi et al., 2010; Abadie et al., 2017).

In this sense, the aim of this study was to determine the immunophenotypes of canine malignant neoplasms using a panel recommended by the St. Gallen Consensus (2013) (Goldshirsch et al., 2011, 2013) to assess whether immunophenotypes are associated with clinicopathological parameters and influence the survival of female dog with malignant mammary neoplasms. The adoption of these well-established markers may provide a better understanding of the prognosis in canine mammary neoplasms immunophenotypes and should be estimated.

Methodology

All procedures were performed according to the guidelines from and after approval by the Animal Experimentation Ethics Committee from the Federal University of Minas Gerais (UFMG) (protocol 366/2016).

Samples

This retrospective study included 170 female dogs admitted to the Oncology Sector of the Veterinary Hospital of the Federal University of Minas Gerais (UFMG), Brazil, whose is diagnosed with mammary gland neoplasms was performed from 2011 to 2015. All samples were obtained from the histopathological archive of the Laboratory of Comparative Pathology of the Institute of Biological Sciences, UFMG, Brazil.

Dogs were eligible for inclusion in this study when the mammary neoplasms were from the histological types: carcinomas in mixed tumors, invasive papillary carcinoma, tubular carcinoma and malignant adenomyoepithelioma (best prognosis) and/or solid carcinoma, micropapillary carcinoma, pleomorphic lobular carcinoma and carcinosarcoma (those with the worst prognosis) (Cassali et al., 2014). Patients with other types of cancer, cases without clinical follow-up after surgical excision and cases whose paraffin blocks were not adequately fixed and preserved were excluded.

The clinicopathological investigated factors of medical records included age dichotomized in ≤ 10 and >10 years, reproductive status (spayed or not spayed), estrous cycle (regular or

irregular), contraceptive use (yes or not), presence or absent of ulceration and adhesion, tumor size dichotomized as ≤ 3.0 and > 3.0 cm, presence or absent lymph nodes metastasis, presence or absent pulmonary metastasis, clinical stage (initial – I-III or advanced IV-V) and recurrence.

All female dogs underwent clinical staging according to the TNM system established by the World Health Organization (WHO) (Owen, 1980) adapted by Sorenmo et al. (2013). This system evaluates: tumors size (T₁: 0-3 cm; T₂: 3-5 cm; T₃: >5 cm); neoplastic involvement of regional lymph nodes (N₀: non metastatic; N₁: metastatic); and presence of distant metastasis (M₀: non metastatic; M₁: metastatic). The presence of lymph node metastasis was diagnosed through hematoxylin-eosin (H&E) routine staining. For the study of distant metastasis, all dogs were underwent thoracic radiography and abdominal ultrasound examination before surgery. Patients were clinically evaluated at the first visit and physical examination, serum exams consisting of a complete blood count, serum biochemistry and imaging exams were repeated every three months over follow-up 2-years period.

Histopathology

After surgical excision, the CMC were sent to the Comparative Pathology Laboratory of the Institute of Biological Sciences/UFMG. All tumors and lymph node specimens were previously fixed in 10% buffered formalin for 48h and processed by routine histological processing and paraffin embedding. Subsequently, 4- μ m thick histological sections were stained with hematoxylin and eosin (HE).

The histological classification followed the criteria proposed by the WHO (Misdorp et al., 1999) and Cassali et al. (2014, 2017). In cases of multiple malignant mammary tumors, the primary lesion of the histological considered of worst prognosis and highest histological grade was selected for analysis. Histological grading of neoplasms was performed following the Nottingham system (Elston and Ellis, 1991). The presence of angiolymphatic invasion (presence of neoplastic cells within the intratumoral and/or peritumoral angiolymphatic vessel spaces) was also evaluated. In the lymph node histological analysis, the neoplastic cells in the lymphoid parenchyma or distributed in the lymphatic sinuses were considered metastases. The analysis of the inflammatory tumor-associated infiltrate was performed on hematoxylin and

eosin sections, with intensity classified as absent, moderate and severe (Estrela-Lima et al., 2010). The peritumoral inflammatory infiltrate was considered positive when moderate to severe.

Immunohistochemical analysis

Consecutive histological sections of 4- μ m thickness were prepared, and immunohistochemical reactions were performed by the streptavidin-biotin-peroxidase complex method using a commercial anti-mouse/anti-rabbit detection system (Novolink Polymer Detection System, Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, (UK) according to the manufacturer's instructions. Antigen retrieval for estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), Ki67 and HER2 was performed using steam heat (Pascal®) with citrate pH 6.0 (Dako Cytomation Target Retrieval Solution, Dako, Glostrup, Denmark). For cytokeratins 5/6 (CK5/6), retrieval was performed in steam heat (Pascal®) with Trilogy® retrieval buffer (Cell Marque, Rocklin, CA, USA). For epidermal growth factor receptor (EGFR), enzymatic antigen retrieval with pepsin occurred in an oven drier at 37°C.

All sections were incubated with the appropriate primary antibody for 16 h in a humidified chamber at 4°C: ER (1:50, clone 1D5, Dako), PR (1:50, hPRa2, Neomarkers, Fremont, CA, USA), HER2 (1:200, polyclonal, Dako), Ki67 (1:50, MIB-1, Dako), EGFR (1:50, clone 31G7, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and CK5/6 (1:50, clone D5/16/B4, Dako). Immunoreactivity was visualized with the chromogen 3'-diaminobenzidine (DAB Substrate System, Dako, Carpinteria, CA, USA) and counterstained with Mayer's hematoxylin. Breast tumor sections from women positive for ER, PR, Ki67, HER2, EGFR and CK5/6 were used as positive controls in each reaction. Negative controls were assessed using normal serum as the primary antibody. All antibodies were previously documented as suitable for detection of epitopes in canine tissues (Ribeiro et al., 2012; Araújo et al., 2016).

Quantification of immunoreactivity

To determine the cell proliferation rate (Ki67) and ER and PR positivity, the number of positive nuclei in a total of 500 neoplastic cells in hotspot areas was manually counted through manual image analysis using the ImageJ software (National Institute of Health,

Bethesda, MD, USA) considering >10% as positive for ER and PR. A value of Ki67 \geq 20% was used to classify cases with a high cell proliferation rate.

HER-2 expression were determined by a scoring system established by the American Society of Clinical Oncology, College of American Pathologists (ASCO/CAP) (Wolff et al., 2013) (0 = no membrane staining or incomplete and faint/barely perceptible membrane staining in \leq 10% of tumor cells; 1 + = incomplete and faint/barely perceptible membrane staining in \geq 10% of tumor cells; 2 + = incomplete and/or weak/moderate membrane staining in >10% of tumor cells or complete and intense membrane staining in \leq 10% of tumor cells; and 3 + = complete and intense membrane staining in >10% of tumor cells). In our study, specimens with scores of 0, 1+ and 2+ were regarded as negative, and score of +3 were defined as positive.

A qualitative evaluation of CK5/6 cytokeratin expression was performed considering the cytoplasmic staining of neoplastic cells as positive. EGFR expression was assessed using criteria adapted from the HER2 assessment, which states that specimens with scores of 0, 1+ and 2+ are considered negative and those with a score of 3+ are considered positive (Wolff et al., 2013).

Immunophenotypes

A classification similar to that proposed by the St. Gallen Consensus (2011; 2013) was used, which stratifies tumors as luminal, HER2-overexpressing or triple-negative. Luminal tumors were subdivided into luminal A, luminal B-HER2-negative and luminal B-HER2-positive, taking into account the cutoff for the cell proliferation rate (Ki67 of 20%) and HER2-overexpressing.

Since 2011, the Saint Gallen Consensus (Goldhirsch et al., 2011) has recommended the use of Ki67 for the classification of luminal subtypes in breast cancer in women. The subtypes are classified as follows: luminal A: ER and/or PR-positive, HER2-negative and low Ki67 (<14%); luminal B HER2-negative: ER and/or PR-positive, HER2-negative and high Ki67 (\geq 14%); luminal B HER2-positive: ER and/or PR-positive and HER2-positive and any Ki67; HER2-overexpressing (non-luminal): ER and PR-negative and HER2-positive; and triple-negative: absence of ER, PR and HER2 expression. In the present study, the optimal cut-off

value for Ki67 was defined by statistical analysis. The 10, 15 and 20% Ki67 cut-offs were tested to disease-free interval (DFI) and specific survival (SS) and only the cutoff value of 20% were significantly associated with a shorter SS and DFI. The triple-negative cases were thus defined as the absence of positivity for ER, PR and HER2 and classified as basal cases when positive for CK5/6 and/or EGFR. The criteria adopted for the definition of the immunohistochemical profile are described in the appendix A: Supplementary material 1.

Supplementary material 1.- Immunohistochemical classification in canine mammary tumor subtypes

Antibody	Luminal A	Luminal B		HER2	Triple-negative	
		HER2 -	HER2 +		Basal-like	Triple-negative
ER or PR	+	+	+	-	-	-
Ki67	<20%	>20%	NS	NS	NS	NS
HER2	-	-	+	+	-	-
CK5/6	indifferent	Indifferent	indifferent	indifferent	+	-
EGFR	indifferent	Indifferent	indifferent	indifferent	+	-

NS: not significant

Treatment and follow-up

Adjuvant cancer treatment was indicated for all patients with aggressive mammary cancers, such as solid carcinoma, micropapillary carcinoma, pleomorphic lobular carcinoma, grade III tubular carcinoma, and carcinosarcoma. For the other histological types, adjuvant chemotherapy was indicated for female dogs with stage IV or V cancer (Cassali et al., 2014).

All patients were followed up for a minimum period of 2 years (24 months) and the maximum follow-up duration was 5.8 years to evaluate disease-free interval (DFI), defined with time interval from mastectomy to first local recurrence or lymph node and/or distant metastasis; specific survival (SS) was defined as the time, in days, between mastectomy and death caused by disease progression; and overall survival (OS) was defined as the period, in days, between mastectomy and death from any cause. All surviving patients at the end of follow-up were censored at the last date recorded in the medical records. Patients lost to follow-up were analyzed up to the date of the last record. Patients who died from causes unrelated to mammary cancer were censored at the date of death. The start time of observation for each

individual (T_0) was defined as the date of surgery of removal of the mammary tumor. Patients were followed up until December 2017.

Statistical analysis

Differences between immunophenotypes of canine mammary cancer and clinicopathologic characteristics were examined using Chi-square test. The Fisher's exact test was used when expected cell counts were less than five. Continuous variables were assessed using Student's *t* test.

Survival curves were calculated using the Kaplan-Meier method to determine disease-free interval, specific survival and overall survival. Differences between survival rates were tested with the log-rank test. To measure the consistency of our results, the statistical analysis DFI, SS and OS of the each variable, were performed on female dogs that underwent mastectomy only, except when the objective was avaluation of the treatment. A multivariate Cox regression analysis was carried out to estimate hazard ratios (HRs) and 95% confidence intervals (CIs). Multivariate analysis included only those variables with a p-value of 0.05 or lower on univariate analysis (log-rank). After this step, all variables with $p < 0.05$ were included in the analysis and selected through the process of "backward elimination." The significance of the parameters of the reduced models and the final model was verified using likelihood ratio test and proportionality of the Cox models was verified using Schoenfeld residuals. The final model included all variables with $p < 0.05$. Three multivariate Cox Hazard models were analysed. Model 1 that includes all the clinicopathological features; Model 2, including all parameters associated with Luminal A profiles; and model 3 the parameters associated with Luminal B HER2-. Due to the low number of cases it was not possible to perform Cox regression with a model of cases with luminal B HER2 + and triple negative neoplasms. For these cases univariate survival analysis (Kaplan-Meier) were performed to evaluate the variables that influenced survival time.

All analyses were performed using Stata software version 14.0 (Stata Corp, College Station, TX, USA).

Results

Immunohistochemical characteristics of CMCs

Four immunophenotypes were identified: luminal A, luminal B HER2-, luminal B HER2+ and triple-negative. Most CMC (88%) were classified as luminal, including 32% luminal A (55/170), 51% luminal B HER2- (86/170) and 5% luminal B HER2+ (9/170). The remainder of cases (12%) were triple-negative (20/170). Of these, 15% (3/20) were positive for CK5/6, corresponding to tumors of the basal-like phenotype.

Positivity for ER and PR was observed in 50% (85/170) and 88% (150/170) of cases, respectively. A high cell proliferation rate (Ki67 \geq 20) was observed in 61% (104/170) of CNC. HER2 protein was overexpressed in 5% (9/170) of cases, all of which were classified as luminal. The basal subtype was identified only by CK5/6 positivity, and no EGFR immunostaining was observed in any of the basal-like cases. The immunohistochemical data of CMCs according to immunophenotypes are summarized in appendix A: Supplementary material 2 and Fig 1.

Supplementary material 2 - Immunohistochemical markers and immunophenotypic classification the of canine mammary tumors

Characteristics	N (%)	Luminal A	Luminal B HER2-	Luminal B HER2+	Triple-negative	P value
	170 (100)	55 (32)	86 (51)	9 (5)	20 (12)	
ER						
Negative	85 (50)	15 (27)	45 (52)	5 (56)	20 (100)	0.000
Positive	85 (50)	40 (73)	41 (48)	4 (44)	0	
PR						
Negative	20 (12)	0	0	0	20 (100)	0.000
Positive	150 (88)	55 (100)	86 (100)	9 (100)	0	
Ki67						
<20	66 (39)	55 (100)	0	2 (22)	9 (45)	0.000
\geq 20	104 (61)	0	86 (100)	7 (78)	11 (55)	
HER2						
Negative	161 (95)	55(100)	86 (100)	0	20 (100)	0.000
Positive	9 (5)	0	0	9 (100)	0	
EGFR						
Negative	153 (90)	46 (83.64)	80 (93.02)	7 (77.78)	20 (100)	0.070
Positive	17 (10)	9 (16.36)	6 (6.98)	2 (22.22)	0	
CK5/6						
Negative	142 (83.53)	51 (92.73)	66 (76.74)	8 (88.89)	17 (85)	0.090
Positive	28 (16.47)	4 (7.27)	20 (11.76)	1 (11.11)	3 (15)	

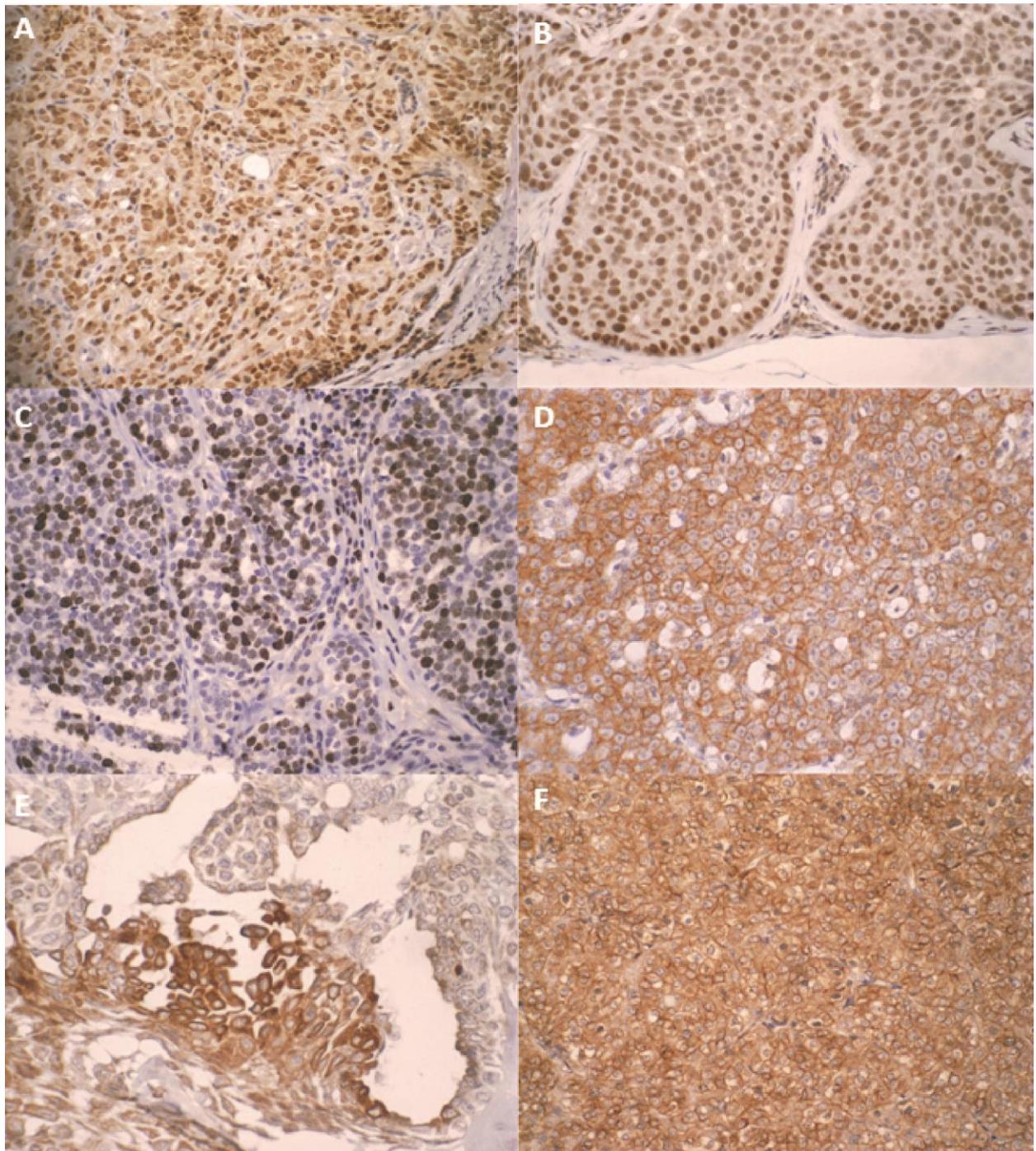


Figure 1 - Immunohistochemical expression of the different proteins studied by IHC in canine mammary tumors. A- ER staining; B- PR staining; C-Ki67 staining; D- HER2 staining; E- CK5/6 staining; F- EGFR staining

Clinicopathological variables and their associations with immunophenotypes

The clinicopathological characteristics of female dogs with mammary neoplasms are summarized in table 1. The mean age at diagnosis was 11.29 ± 2.88 years, with a minimum age of three years and a maximum age of 21 years. There were no significant differences between immunophenotypes regarding age at diagnosis ($P > 0.05$). More than half (60%) of female dogs were not spayed at the time of diagnosis, with a higher percentage in the luminal A immunophenotype, followed by the triple-negative immunophenotype ($P < 0.001$).

Tumor size ranged from 0.4 to 20.0 cm (mean of 5.23 ± 3.99 cm), with a higher frequency of lesions larger than 5.0 cm in diameter occurring in all immunophenotypes, except for the luminal A subtype, with no significant difference between subtypes ($P > 0.05$). For the luminal A subtype, 57% of cases showed early stage clinical (I-III), while for the other subgroups ($P = 0.040$), there were higher percentages in advanced stages (IV-V) (luminal B HER2-: 56%; luminal B HER2+: 78% and triple negative: 58%). Histological grade I and II ($P < 0.001$) was observed with higher frequency luminal A neoplasms. This subtype was also associated with a higher frequency of carcinomas in mixed tumors (42%, 23/55). In female dogs with luminal B HER2- subtype was regular estrous cycle was reported in 90% of cases ($P < 0.001$), high frequently observed of the solid carcinoma (31%, 27/86) and micropapillary carcinoma (21%, 18/86) and histological grade II ($P < 0.001$). In relation to the other immunophenotypes angiolympathic invasion presence ($P = 0.015$) and histological grade III ($P < 0.001$) was most frequently in luminal B HER2+ neoplasms. Triple negative neoplasms were associated with a higher frequency of advanced clinical stage and higher histological grade (III).

Table 1 - Clinicopathological characteristics of female dogs with malignant mammary neoplasms according to immunophenotypes.

Characteristics	N (%)	Luminal A	Luminal B HER2-	Luminal B HER2+	Triple negative	P value
Age (mean±SD)		11.11±2.49	11.44±2.306	10.50±3.81	11.50±2.89	0.660
Reproductive status						
Spayed	53 (40)	10 (23)	35 (54)	6 (75)	2 (14)	<0.001
Not spayed	78 (60)	34 (77)	30 (46)	2 (25)	12 (86)	
Contraceptive use						
No	113 (94)	41 (97)	55 (93)	9 (90)	8 (89)	0.619
Yes	7 (6)	1 (3)	4 (7)	1 (10)	1 (11)	
Estrous cycle						
Regular	96 (79)	25 (58)	56 (92)	8 (100)	7 (70)	<0.001
Irregular	26 (21)	18 (42)	5 (8)	0	3 (30)	
Tumor size						
T1 <3.0 cm	47 (28)	21 (39)	22 (25)	2 (22)	2 (10)	0.231
T2 3.0-5.0 cm	33 (20)	11 (20)	17 (20)	2 (22)	3 (16)	
T3 >5.0 cm	88 (52)	22 (41)	47 (55)	5 (56)	14 (74)	
Clinical stage						
I	23 (14)	13 (24)	9 (11)	0	1 (5)	0.040
II	15 (9)	7 (13)	6 (7)	1 (11)	1 (5)	
III	40 (24)	11 (20)	22 (26)	1 (11)	6 (32)	
IV	80 (48)	23 (43)	40 (47)	7 (78)	10 (53)	
V	9 (5)	0	8 (9)	0	1 (5)	
Histological type						
Malignant adenomyoepithelioma	10 (6)	2 (4)	6 (7)	0	2 (10)	<0.001
Pleomorphic lobular carcinoma	5 (3)	2 (4)	1 (1)	0	2 (10)	
Micropapillary carcinoma	33 (19)	8 (14)	18 (21)	4 (44)	3 (15)	
Invasive papillary carcinoma	8 (5)	4 (7)	3 (3)	0	1 (5)	
Solid carcinoma	39 (23)	5 (9)	27 (31)	4 (44)	3 (15)	
Carcinosarcoma	26 (15)	6 (11)	16 (19)	0	4 (20)	
Tubular carcinoma	17 (10)	5 (9)	11 (13)	0	1 (5)	
Carcinoma in mixed tumor	32 (19)	23 (42)	4 (5)	1 (11)	4 (20)	
Histological grade						
I	22 (18)	17 (41)	3 (5)	0	2 (15)	<0.001
II	58 (47)	18 (44)	33 (53)	3 (38)	4 (31)	
III	44 (35)	6 (15)	26 (42)	5 (62)	7 (54)	
Inflammatory infiltrate						
Absent	75 (73)	25 (73)	34 (67)	7 (100)	9 (90)	0.200
Present	27 (27)	9 (27)	17 (33)	0	1 (10)	
Angiolymphatic invasion						
Absent	107 (69)	42 (82)	46 (60)	4 (44)	15 (79)	0.015
Present	48 (31)	9 (18)	30 (40)	5 (56)	4 (21)	
Metastasis development						
No	138 (81)	51 (98)	61 (71)	9 (75)	17 (85)	0.001
Yes	32 (19)	1 (2)	25 (29)	3 (25)	3 (15)	

Differences of the survival between CMC immunophenotypes

The univariate survival analysis (Kaplan-Meier) revealed significant difference between the immunophenotypes subtypes for CMCs. In analysis of disease-free interval, the luminal B HER2 + and triple negative subtypes were associated with a shorter DFI in relation to luminal A neoplasms (P=0.024), Figure 2A. The luminal A subtype has the best specific survival among the four subtypes

(P=0.040), Figure 2B. Comparatively, the luminal A group too had the highest overall survival rate, followed by Luminal B HER2- and Triple negative. While the lowest survival was observed in Luminal B HER2+ patients (P=0.022), Figure 2C.

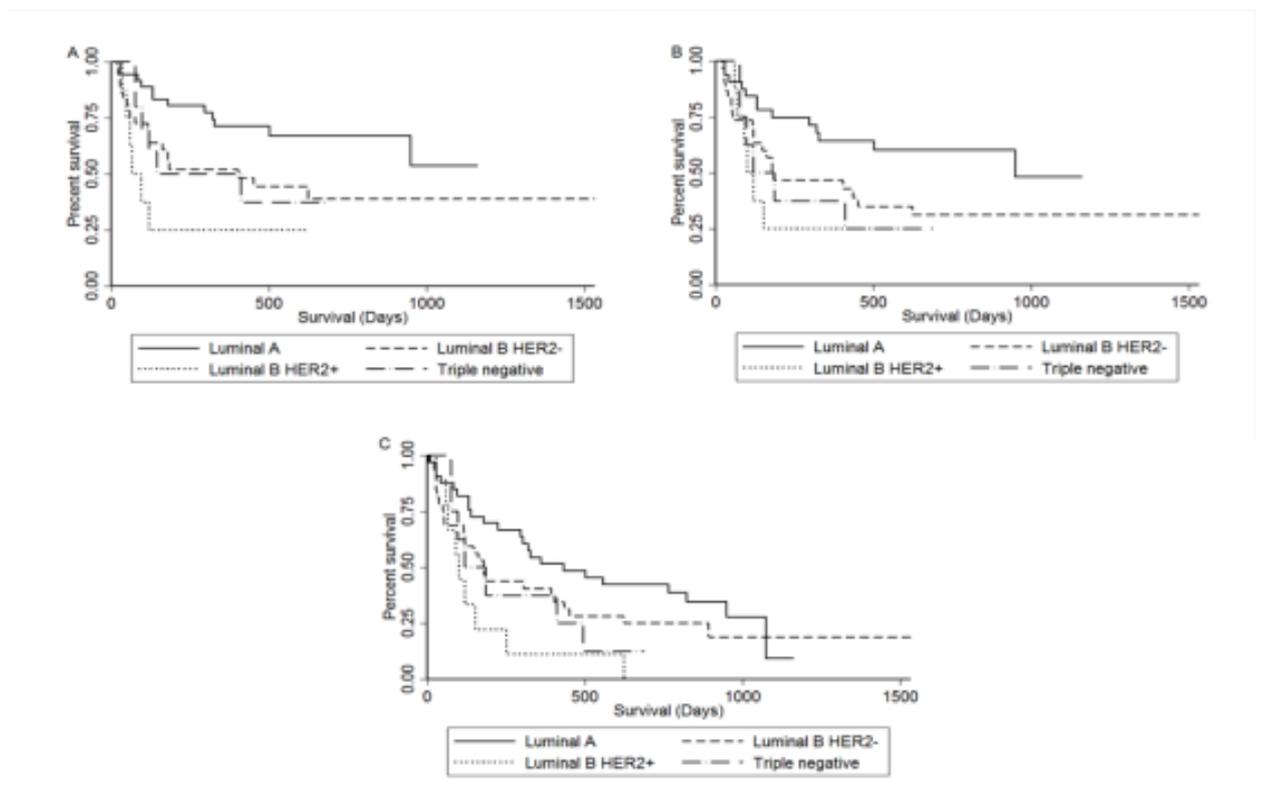


Figure 2- Kaplan-Meier survival curve of female dogs with mammary tumors according to the immunophenotype treated with surgery alone (n=107 cases). A- Specific survival: Luminal A: median: 950 days; Luminal B HER2-:median: 186 days; Luminal B HER2+: median:102 days; Triple-negative: median: 120 days, P= 0.0402; B – disease-free interval: Luminal A: median: 950 days; Luminal B HER2-:median: 180 days; Luminal B HER2+: median: 68 days; Triple-negative: median: 120 days, P=0.0249; C- Overall survival:

Luminal A: median: 434 days; Luminal B HER2-:median: 180 days; Luminal B HER2+: median: 102 days; Triple-negative: median: 120 days, P=0.0221.

Clinical stage x Immunophenotypes

To evaluate the influence of the clinical stage on each immunophenotype, specific survival analyzes were performed. In Kaplan–Meier univariate for specific survival for the different immunophenotypes according to clinical stage revealed that the median survival of female dog with luminal A subtype in stage IV-V was 950 days, with a significant difference compared to stage I-III (did not reach the median) (P=0.033) (Figure 3A). For the luminal B HER2- subtype, female dog with stage IV-V had a median survival of 120 days, and those with stage I-III did not reach the median (Figure 3B) (P= 0.004). In the luminal B HER2+ subtype, a shorter specific survival was observed in stage IV-V (median of 91 days) compared with stage I-III, with a median of 624 days (P= 0.034) (Figure 3C). There was no difference in specific survival between the different clinical stages in female dog with the triple-negative subtype (Figure 3D) (P=0.653), female dog with stage IV-V had a median survival of 98 days, and those with stage I-III, with a median of 187 days.

When comparing the specific survival curves by univariate analysis of patients diagnosed at initial clinical stage (I-III) contraceptive use (P<0.001), recurrence (P=0.026), histological type micropapillary carcinoma (median of 98 days, P= 0.043) were significantly associated with a lower survival (SS). Only micropapillary carcinoma was associated with an increased risk of death (HR=6.84, CI:1.36-34.35, P=0.019).

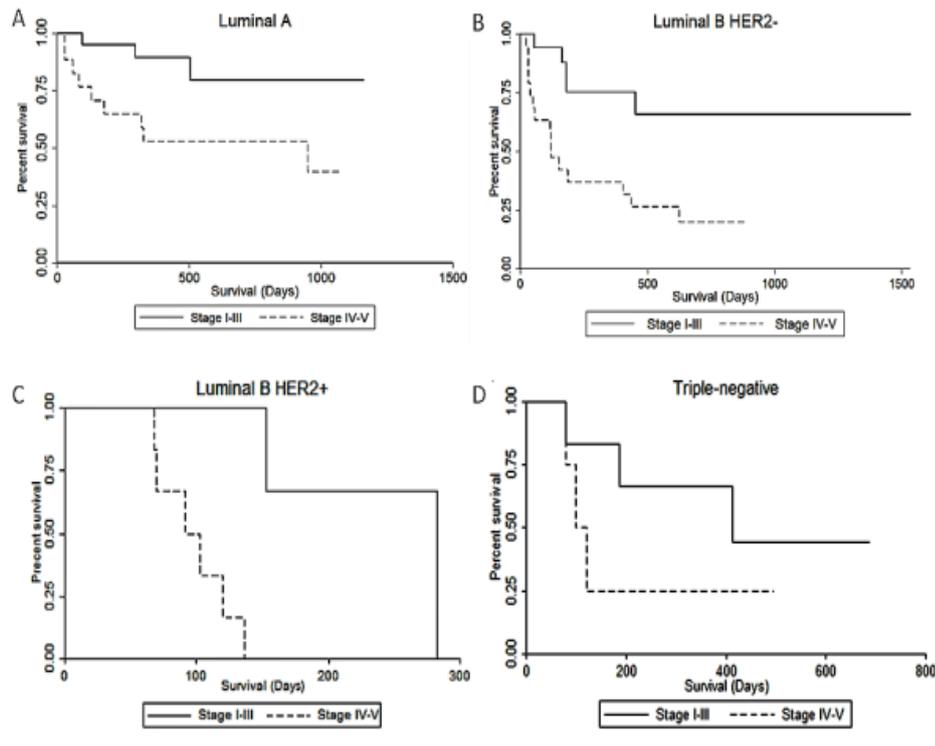


Figure 3 - Kaplan-Meier specific survival curve of female dog with mammary tumors according to the immunophenotypes treated with surgery alone according to clinical stage initial (I-III) or advanced (IV-V). **A-** Luminal A: Stage I-III, did not reach the median survival and stage IV-V, median: 950 days, $P=0.033$; **B-** Luminal B HER2- Stage I-III, did not reach the median survival and stage IV-V, median:120 days, $P=0.017$; **C-** Luminal B HER2+ Stage I-III, did not reach the median survival and stage IV-V, median: 91days, $P=0.034$; **D-** Triple-negative Stage I-III, median: 187 days) and stage IV-V, median: 98 days, $P>0.653$.

Prognostic factors associated with immunophenotypes

In univariate analysis for DFI contraceptive use ($HR=7.52$, $CI:2.23-25.28$, $P=0.001$), advanced clinical stage ($HR=3.04$, $CI:1.56-5.92$, $P=0.001$), histological type of the worst prognosis ($HR=8.44$, $CI:3.49-20.41$, $P<0.001$), high histological grade ($HR=15.34$, $CI:2.08-112.82$, $P=0.007$), presence of angiolymphatic invasion ($HR=4.70$, $CI:2.52-9.12$, $P<0.001$), recurrence ($HR=2.82$, $CI:1.44-5.53$, $P=0.003$) and immunophenotype luminal B HER2+ ($HR=3.65$, $CI:1.35-9.82$, $P=0.010$) showed higher risk of cancer progression (Table 2). In multivariate analysis of DFI remained in the model final only clinical stage IV-V ($HR=3.18$, $CI:1.62-6.22$, $P=0.001$) and immunophenotypes with higher risk of cancer progression associated with Luminal B HER2+ ($HR=4.12$, $CI:1.47-11.52$, $P=0.007$) compared to the

luminal A immunophenotype. The luminal B HER2- subtype exhibited a HR=2.50 (CI=1.20-5.19, P=0.014) risk of cancer progression compared to the luminal A subtype (Table 3).

In univariate for specific survival, contraceptive use (HR= 8.28, CI:2.51-27.28, P=0.001), clinical stage IV-V (HR= 2.93. CI:1.50-5.71, P=0.002), histological type of the worst prognosis (HR= 8.45, CI:3.49-20.44, P<0.001), histological grade II-III (HR=15.38, CI: 2.09-113.10, P=0.007), presence of angiolymphatic invasion (HR=4.52, CI:2.38-8.57, P<0.001), recurrence (HR=2.51, CI:1.27-4.93, P=0.008) and immunophenotype: luminal B HER2+ (HR= 3.30, CI:1.23-.89, P=0.018) showed higher risk of death (Table 2). In multivariate analysis an increased risk of death was observed in female dog with clinical stage IV-V (HR=3.01, CI=1.54-5.88, P=0.001) and with immunophenotype Luminal B HER2+ (HR= 3.55, CI=1.27-9.90, P=0.015). The luminal B HER2- subtype exhibited a HR= 2.33 (CI=1.12-4.83, P=0.023) and triple negative (HR=3.02, CI:1.11-8.23, P=0.030) risk of death compared to the luminal A.

In univariate analysis for overall survival contraceptive use (HR= 5.45, CI: 1.75-16.96 P=0.003), tumor size >3.0 cm (HR= 1.76, CI: 1.01-3.05, P= 0.043), clinical stage IV-V (HR= 1.81, CI:1.09-3.01, P=0.002), histological type of the worst prognosis (HR=4.14, CI:2.32-7.37, P<0.001), histological grade II-III (HR=3.74, CI:1.56-8.94, P=0.003), presence of the angiolymphatic invasion (HR=3.27, CI:1.89-5.64, P<0.001), recurrence (HR=2.41, CI:1.33-.4.38, P=0.004) and immunophenotype luminal B HER2+ (HR= 3.22, CI:1.45-7.13, P=0.004) showed higher risk of death (Table 2). In analyze multivariate remained in the model final OS only clinical stage IV-V (HR=1.92, CI=1.14-3.21, P=0.013) and among the immunophenotypes, an increased risk of death was associated with immunophenotypes Luminal B HER2+ (HR = 3.49, CI=1.54-7.88, P=0.003) of death compared to the luminal A subtype.

Table 2 - Univariate analysis comparing clinical and histopathological aspects of canine mammary tumors

Variables	Disease-free interval		Specific survival		Overall survival	
	HR (95% IC)	P value	HR (95% IC)	P value	HR (95% IC)	P value
Age						
<10 years versus >10 years	1.34 (0.71-2.50)	0.353	1.40 (0.75-2.62)	0.287	1.58 (0.92-2.69)	0.093
Reproductive status						
Neutered versus intact	0.68 (0.32-1.43)	0.315	0.70 (0.34-1.47)	0.360	0.94 (0.51-1.72)	0.855
Contraceptive use						
No versus Yes	7.52 (2.23-25.28)	0.001	8.28 (2.51-27.28)	0.001	5.45 (1.75-16.96)	0.003
Estrous cycle						
Regular versus irregular	0.62 (0.25-1.54)	0.307	0.64 (0.26-1.61)	0.351	0.75 (0.37-1.52)	0.436
Tumor size						
< 3 cm versus ≥ 3 cm	1.68 (0.85-3.31)	0.130	1.80 (0.91-3.53)	0.088	1.76 (1.01-3.05)	0.043
Clinical stage						
I-III versus IV-V	3.04 (1.56-5.92)	0.001	2.93 (1.50-5.71)	0.002	1.81 (1.09-3.01)	0.022
Histological type						
Best prognosis versus worst prognosis	8.44 (3.49-20.41)	0.000	8.45 (3.49-20.44)	0.000	4.14 (2.32-7.37)	0.000
Histological grade						
I versus II-III	15.34 (2.08-112.82)	0.007	15.38 (2.09-113.10)	0.007	3.74 (1.56-8.94)	0.003
Inflammation						
Absent versus present	1.50 (0.70-3.21)	0.290	1.44 (0.67-3.07)	0.343	1.54 (0.83-2.85)	0.162
Angiolymphatic invasion						
Absent versus present	4.79 (2.52-9.12)	0.000	4.52 (2.38-8.57)	0.000	3.27 (1.89-5.64)	0.000
Ulceration						
Absent versus present	0.93 (0.44-1.94)	0.853	0.98 (0.47-2.04)	0.961	0.84 (0.44-1.58)	0.596
Adhesion						
Absent versus present	1.16 (0.58-2.32)	0.658	1.24 (0.627-2.48)	0.526	1.27 (0.71-2.26)	0.404
ER						
ER+ versus ER-	0.42 (0.22-0.81)	0.010	0.44 (0.23-0.85)	0.015	0.56 (0.33-0.93)	0.026
PR						
PR+ versus PR-	0.50 (0.21-1.23)	0.134	0.48 (0.20-1.17)	0.111	0.72 (0.32-1.59)	0.419
KI67						
>20% versus <20%	1.92 (1.05-3.51)	0.032	1.83 (1.00-3.34)	0.048	1.40 (0.85-2.29)	0.177
HER2						
HER2+ versus HER2-	2.22 (0.92-5.33)	0.073	2.04 (0.85-4.90)	0.108	2.49 (1.21-5.15)	0.013
EGFR						
EGFR+ versus EGFR-	0.39 (0.09-1.62)	0.196	0.40 (0.09-1.65)	0.207	1.08 (0.49-2.37)	0.843
CK5/6						
CK5/6+ versus CK5/6-	0.67 (0.29-1.53)	0.346	0.67 (0.29-1.53)	0.347	1.00 (0.52-1.94)	0.980
Recurrence						
No versus Yes	2.82 (1.44-5.53)	0.003	2.51 (1.27-4.93)	0.008	2.41 (1.33-4.38)	0.004
Immunophenotypes						
Luminal B HER2- versus Luminal A	2.24 (1.10-4.53)	0.024	2.14 (1.05-4.32)	0.034	1.50 (0.85-2.64)	0.157
Luminal B HER2+ versus Luminal A	3.65 (1.35-9.82)	0.010	3.30 (1.23- 8.89)	0.018	3.22 (1.45-7.13)	0.004
Triple negative versus Luminal A	2.50 (0.94-6.67)	0.065	2.55 (0.96-6.80)	0.060	1.90 (0.81-4.49)	0.139

Table 3- Multivariate analysis comparing clinical and histopathological aspects, included in the final model, of canine mammary tumors.

Variables	HR (95% IC)	P value	HR (95% IC)	HR (95% IC)	P value
	<i>Disease-free interval</i>		<i>Specific survival</i>		<i>Overall survival</i>
Clinical stage					
I-III <i>versus</i> IV-V	3.18 (1.62-6.22)	0.001	3.01 (1.54-5.88)	0.001	1.92 (1.14-3.21) 0.013
Immunophenotypes					
Luminal B HER2- <i>versus</i> Luminal A	2.50 (1.20-5.19)	0.014	2.33 (1.12-4.83)	0.023	1.60 (0.90-2.84) 0.109
Luminal B HER2+ <i>versus</i> Luminal A	4.12 (1.47-11.52)	0.007	3.55 (1.27-9.90)	0.015	3.49 (1.54-7.88) 0.003
Triple negative <i>versus</i> Luminal A	2.88 (1.06-7.85)	0.038	3.02 (1.11-8.23)	0.030	2.14 (0.89-5.10) 0.086

Prognostic factors associated Luminal A subtype

In analyze univariate for DFI and SS (Table 4), the factors associated with a higher risk of cancer progression and death were contraceptive use (HR=38.21, CI:3.38-430.78, P=0.003), clinical stage IV-V (HR=3.79, CI: 1.01-14.19, P=0.048), histological type of the worst prognosis (HR=33.64, CI:3.97-284.51, P=0.001), presence of angiolymphatic invasion (HR=9.84, CI:2.70-35.88, P=0.001) and histological grade II-III (HR=10.50, CI:1.32-83.08, P=0.026). In the Cox regression multivariate analysis only clinical stage IV-V remained in the final model (Table 4).

In univariate analysis for OS an increased risk of death was associated with age > 10 years (HR=2.69, CI: 1.06-6.83, P=0.037), histological type of worst prognosis (HR=9.85, CI:3.08-31.48, P=0.001), presence of the angiolymphatic invasion (HR=4.75, CI:1.63-13.83, P=0.004) and histological grade II-III (HR=3.06, CI:1.12-8.34, P=0.029). In multivariate Cox regression only presence of the angiolymphatic invasion remained in the final model (Table 4).

Table 4- Univariate and multivariate analysis comparing clinical and histopathological aspects of canine mammary tumors with immunophenotypes Luminal A.

Variables	HR (95% IC)	P value	HR (95% IC)	P value	HR (95% IC)	P value
	<i>Disease-free interval</i>		<i>Specific survival</i>		<i>Overall survival</i>	
<i>Univariate analysis</i>						
Age						
<10 years versus >10 years	1.83 (0.77-10.34)	0.114	2.83 (0.77-10.34)	0.114	2.69 (1.06-6.83)	0.037
Reproductive status						
Neutered versus intact	0.39 (0.11-1.34)	0.136	0.39 (0.11-1.34)	0.136	0.59 (0.22-1.54)	0.287
Contraceptive use						
No versus Yes	38.21 (3.38-430.78)	0.003	38.21 (3.38- 430.78)	0.003	5.20 (0.54-50.06)	0.153
Estrous cycle						
Regular versus irregular	1.69 (0.51-5.61)	0.388	1.69 (0.51-5.61)	0.388	1.18 (0.49-2.84)	0.700
Tumor size						
< 3 cm versus ≥ 3 cm	2.05 (0.59-7.05)	0.255	2.05 (0.59-7.05)	0.255	2.34 (0.94-5.78)	0.065
Clinical stage						
I-III versus IV-V	3.79 (1.01-14.19)	0.048	3.79 (1.01-14.19)	0.048	1.31 (0.57-2.98)	0.516
Histological type						
Best prognosis versus worst prognosis	33.64 (3.97-284.51)	0.001	33.64 (3.97-284.51)	0.001	9.85 (3.08-31.48)	0.001
Histological grade						
I versus II-III	10.50 (1.32-83.08)	0.026	10.50 (1.32-83.08)	0.026	3.06 (1.12-8.34)	0.029
Inflammation						
Absent versus present	0.87 (0.18-4.14)	0.865	0.87 (0.18-4.14)	0.865	1.45 (0.55-3.81)	0.442
Angiolymphatic invasion						
Absent versus present	9.84 (2.70-35.88)	0.001	9.84 (2.70-35.88)	0.001	4.75 (1.63-13.83)	0.004
Ulceration						
Absent versus present	1.90 (0.49-7.26)	0.347	1.90 (0.49-7.26)	0.347	1.19 (0.40-3.50)	0.747
Adhesion						
Absent versus present	1.01 (0.21-4.74)	0.990	1.01 (0.21-4.74)	0.990	1.06 (0.36-3.07)	0.913
Recurrence						
No versus Yes	1.49 (0.19-11.69)	0.702	1.49 (0.19-11.69)	0.702	2.60 (0.76-8.90)	0.128
Metastasis development						
No versus Yes	18.80 (1.70-207.48)	0.017	18.80 (1.70-207.48)	0.017		
Variables	HR (95% IC)	P value	HR (95% IC)	P value	HR (95% IC)	P value
<i>Multivariate analysis</i>						
Clinical stage						
I-III versus IV-V	3.79 (1.01-14.19)	0.048	3.79 (1.01-14.19)	0.048		
Angiolymphatic invasion						
Absent versus present					4.75 (1.63-13.83)	0.004

Prognostic factors associated Luminal B HER2-subtype

The factors associated with a higher risk of cancer progression (DFI) were clinical stage IV-V (HR=3.38, CI:1.21-9.38, P=0.019) and angiolymphatic invasion (HR=2.68, CI:1.02-7.03, P=0.044), in analysis univariate. In the Cox regression analysis only clinical stage IV-V (HR=3.38, CI:1.21-9.38, P=0.019) remained in the final model.

In univariate analysis for SS (Table 5), the factors associated with a higher risk of death were clinical stage IV-V (HR=3.19, CI: 1.15- 8.84, P=0.025), presence of inflammatory infiltrate (HR=3.05, CI:1.00-9.22, P=0.048), presence of angiolymphatic invasion (HR=3.17, CI: 1.21- 8.30, P=0.019) and recurrence (HR=3.29, CI: 1.28-8.47, P=0.013). In the Cox multivariate analysis only clinical stage IV-V (HR=3.54, P=0.033, CI: 1.10-11.38) and the presence of inflammatory infiltrate (HR=3.24, P=0.042, CI:1.04-10.03) remained in the final model (Table 5).

The variables inflammatory infiltrate (HR=2.89, CI:1.05-7.92, P=0.039), presence of the angiolymphatic invasion (HR=3.06, CI:1.29-7.28, P=0.011) and recurrence (HR=3.11, CI:1.29-7.47, P=0.011) was associated with an increased overall survival by univariate analysis. Only angiolymphatic invasion (HR=2.78, CI:1.13-6.83, P=0.025) and recurrence (HR=3.68, CI:1.35-10.02, P=0.010) remained as independent prognostic predictor related to OS.

Prognostic factors associated Luminal B HER2+ subtype

The variables clinical stage IV-V (Log-rank test: P=0.034), tumor size >3.0 cm (Log-rank test: P=0.003) and presence of the angiolymphatic invasion (Log-rank test: P=0.013) was associated lower DFI. In the specific survival analysis female dogs not spayed (Log-rank test: P=0.017), contraceptive use (Log-rank test: P=0.025), clinical stage IV-V (Log-rank test: P=0.034) and presence of the angiolymphatic invasion (Log-rank test: P=0.048) revealed significantly association with a shorter SS. In the overall survival analysis female dogs not spayed (Log-rank test: P=0.010) and presence of the angiolymphatic invasion (Log-rank test: P=0.036) revealed significantly association with a shorter OS.

Prognostic factors associated with Triple negative subtype

Histological type of the worst prognosis were associated with lower DFI, specific survival time and overall survival (Log-rank test: P=0.012).

Table 5 – Univariate and multivariate analysis comparing clinical and histopathological aspects of canine mammary tumors with immunophenotypes Luminal B HER2-.

Variables	Disease-free interval		Specific survival		Overall survival	
	HR (95% IC)	P value	HR (95% IC)	P value	HR (95% IC)	P value
<i>Univariate analysis</i>						
Age						
<10 years versus >10 years	0.53 (0.07-3.94)	0.504	1.02 (0.39-2.66)	0.964	1.07 (0.44-2.60)	0.870
Reproductive status						
Neutered versus intact	1.40 (0.12-15.83)	0.783	0.94 (0.28-3.10)	0.927	1.19 (0.41-3.41)	0.743
Contraceptive use						
No versus Yes	0.43 (0.03-5.13)	0.512	4.69 (0.85-25.80)	0.076	3.80 (0.73-19.70)	0.111
Tumor size						
< 3 cm versus ≥ 3 cm	0.65 (0.05-7.53)	0.737	0.86 (0.28-2.61)	0.792	0.81 (0.30-2.21)	0.690
Clinical stage						
I-III versus IV-V	3.38 (1.21-9.38)	0.019	3.19 (1.15-8.84)	0.025	2.31 (0.98-5.42)	0.053
Histological type						
Best prognosis versus worst prognosis			4.14 (0.95-17.99)	0.058	3.27 (0.97-11.00)	0.055
Histological grade						
I versus II-III	1.39 (0.13-14.44)	0.780	1.56 (0.58-4.17)	0.372	1.98 (0.79-4.90)	0.143
Inflammation						
Absent versus present	2.88 (0.94- 8.86)	0.064	3.05 (1.00-9.22)	0.048	2.89 (1.05-7.92)	0.039
Angiolymphatic invasion						
Absent versus present	2.68 (1.02-7.03)	0.044	3.17 (1.21-8.30)	0.019	3.06 (1.29-7.28)	0.011
Ulceration						
Absent versus present	3.87 (0.23-63.33)	0.342	0.44 (0.12-1.52)	0.196	0.52 (0.17-1.53)	0.238
Adhesion						
Absent versus present	3.87 (0.23-63.33)	0.342	0.62 (0.18-2.13)	0.453	0.84 (0.31-2.28)	0.745
Recurrence						
No versus Yes	2.50 (0.98-6.39)	0.055	3.29 (1.28-8.47)	0.013	3.11 (1.29-7.47)	0.011
<i>Multivariate analysis</i>						
	Disease-free interval		Specific survival		Overall survival	
	HR (95% IC)	P value	HR (95% IC)	P value	HR (95% IC)	P value
Variables						
Clinical stage						
I-III versus IV-V	3.38 (1.21-9.38)	0.019	3.54 (1.10-11.38)	0.033		
Inflammation						
Absent versus present			3.24 (1.04-10.03)	0.042		
Angiolymphatic invasion						
Absent versus present					2.78 (1.13-6.83)	0.025
Recurrence						
No versus Yes					3.68 (1.35-10.02)	0.010

Treatment x immunophenotypes

After mastectomy, a total of 63 female dogs received four sessions of carboplatin at 300 mg/m², given intravenously every 21 days. All tutors were informed of the prognosis and indication for chemotherapy, however, adjuvant treatment was not performed in 107 patients (which were treated exclusively by surgery), as decided by their owners.

Although no statistically significant difference was observed among the four treatment groups of immunophenotypes, patients treated with adjuvant chemotherapy presented a better clinical outcome, when compared to surgery as an only treatment. At the advanced stage a specific survival rate of 50% was observed in female dog of treated only with surgery, with a median of 329 days, in relation to the survival rate of 80% of female dog treated with adjuvant therapy (it does not reach the median) (P = 0.178). The same proportion was observed for DFI (P = 0.250).

In initial clinical stage in the luminal B HER2- group, a specific survival rate of 55% was observed in female dog treated exclusively for surgery, whereas female dog submitted to adjuvant therapy had a survival rate of 60% (P = 0.8409). In advanced clinical stage, 16% of surgery-treated female dog (median 120 days) and 27% of female dog receiving chemotherapy (median of 267 days) survived within two years (P = 0.1297). A rate of 16% DFI was observed in female dog treated only with surgery (median of 118), in the group that received chemotherapy the rate was 25% (median of 239 days) (P = 0.09). Due to the low number of cases, in an initial clinical stage, it was not possible to evaluate the relationship between therapeutic complementation and surgery in patients with the luminal B HER2 + and triple negative subtype. In an advanced clinical stage, patients with the luminal B HER2 + subtype treated with surgery presented a median of 91 days, patients treated with chemotherapy had a median of 69 days (P = 0.898). The disease free time was 60 and 51 days (median) for female dog treated with surgery and surgery and chemotherapy, respectively. Patients with the triple negative subtype treated with surgery had a shorter survival time (median 98 days) compared to female dog submitted to chemotherapy (median at 486 days) (P=0.153). The disease free interval was 98 days for female dog treated with surgery and 393 days for female dog submitted to adjuvant chemotherapy (P = 0.153).

Discussion

The canine mammary cancer is characterized by heterogeneity, exhibiting a wide variety of clinical presentations in patients with the same diagnosis and clinical staging, being increasing interest of the study immunophenotype in CMCs. This study identified the distribution and prognostic value of immunophenotypes in CMCs by means of the immunohistochemical panel and classification recommended by St Gallen (Goldshirsch et al., 2011). This is the first study to subdivide the luminal subtypes into three categories: luminal A, luminal B HER2- and luminal B HER2 +. According to this classification, the most frequent immunohistochemical subtypes were luminal B HER2 - (51%) followed luminal A (32%). This finding differs from that observed in a recent study of 350 canine mammary carcinomas (Abadie et al., 2017), which demonstrated that the triple negative basal-like was the most frequent subtype, with a percentage of 58.6%, followed by triple nonbasal-like negative (17.7%). This may be justified by differences methodology of the immunophenotypes classification, histological types studied and methodology used for immunohistochemical labeling, where the authors used antibodies in different dilutions, clones and antigenic retrieval compared with present study. However, Gama et al. (2008) used a panel of five markers (ER, HER2, CK5, p63 and P-cadherin) and detected the following phenotypes: luminal A (44.8%), luminal B (13.5%), HER2-overexpressing (8.3%), basal-like (29.22%) and null/negative phenotype (4.2%). Sassi et al. (2010) identified only luminal A (19%), luminal B (49%) and basal-like (22%) subtypes using the markers ER, PR, HER2, CK5/6 and CK14. Subsequently, six antibodies were used to classify luminal A (44%), luminal B (22.6%), HER2-overexpressing (5.7%), basal-like (24.5%) and normal breast-like subtypes (3.1%): ER, HER2, CK14, P63 and vimentin (Im et al., 2014). All of these authors observed a higher frequency of luminal tumors, corroborating with the results obtained in the current study.

The different criteria for classification, selection and quantification of immunohistochemical markers are factors that make it difficult to compare the results of the various immunophenotype studies in canine mammary neoplasms. In previous studies, hormone receptor positivity (ER and/or PR) and HER2 overexpression were the criteria used to classify the luminal B subtype (Gama et al., 2008, Sassi et al., 2010), which corresponds to the luminal B HER2 + subtype described in this study, although the terminology is different.

However, the results observed in the present study show a lower frequency of this subtype in relation to previous studies, which we attributed to the classification criteria used in the present study, which followed the established for breast cancer in women, considering as positive for HER2 only the +3 cases. The Ki67 score, with a cutoff of 33%, was recently considered for the molecular classification of malignant mammary tumors of female dog (Abadie et al., 2017). Tumors were classified as luminal A (ER and/or PR+, HER2, Ki67 <33%) and luminal B (ER and/or PR+, HER2, Ki67 \geq 33%). However, the present study suggests that a cutoff point for Ki67 of 20% can be adopted to discriminate and predict the prognosis of the luminal A and luminal B HER2- subtypes, since female dogs with mammary cancer with score of ki67 greater than 20 % presented lower survival.

The absence of the HER2-overexpressing phenotype in the study population can be justified by the high frequency of positivity for ER and/or PR observed and by the methodology used, which considered only 3+ cases as HER2-positive. These results corroborate with findings by Abadie et al. (2017), who did not identify HER2-overexpressing cases and used the same methodology as the present study. Other authors reported the presence of the HER2-overexpressing subtype in 8.3% and 5.7% of canine mammary tumors evaluated, but the authors considered tumors that expressed HER2 with incomplete and/or weak/moderate membrane staining in >10% cells or with strong and complete membrane staining in \leq 10% of the tumor cells (2+) as positive (Gama et al., 2008, Im et al., 2014). According Peña et al. (2014), for canine mammary tumors, there should be a standardization considering only cases with a 3+ score (complete expression in more than 10% of neoplastic cells).

The best prognosis of the luminal A subtype was confirmed by its association with early clinical stage, low histological grade, lower rates of recurrence and metastasis and higher survival rates. The best biological behavior of the luminal A subtype is due the expression of genes and proteins that are typically expressed by luminal epithelial cells of the mammary (positivity to estrogen receptors, ER, and to progesterone receptors, PR, and negativity to HER2). It is established in the literature that the elevated expression of hormone receptors occurs in the normal mammary gland and benign mammary neoplasms (Sorenmo et al., 2013). However, malignant neoplasms may also exhibit positive expression of these receptors. Thus, neoplasms with ER and PR positive expression have a better prognosis, since the tumor cells that constitute the lesion are more similar to the normal cells of the mammary

gland. On the other hand, the negative marking of these receptors is related to breast tumors with more marked malignancy characteristics (Peña et al., 2014; Kim et al., 2013). Other authors have reported longer survival and a lower risk of death for the luminal A subtype compared to the other immunophenotype subtypes (Gama et al., 2008, Abadie et al., 2017). Similarly, Ribeiro et al. (2012) found a predominance of the luminal A immunophenotype among carcinomas in mixed tumors, which are considered histologic types of better prognosis.

The luminal B HER2- subtype has associated with poor prognostic factors, such as advanced clinical stage, presence of angiolymphatic invasion, recurrence and shorter survival, compared to the luminal A subtype. The worse prognosis of the luminal B HER2- subtype compared to the luminal A may be due to the increased cell proliferation rate, as this group included tumors with Ki67 >20% while luminal A have <20% and solid carcinoma, type histological of worst prognosis.

Although the relationship between HER2 overexpression and prognosis in CMCs is still not well established, the worst prognosis of the luminal B HER2 + subtype may be associated with overexpression of the HER2 protein. Dutra et al. (2004) demonstrated that HER2 protein expression was associated with more aggressive CMCs. In fact, we observed a higher frequency of solid carcinoma and micropapillary carcinoma in luminal B HER2+ neoplasms, factors which may be contributing to lower survival and disease-free interval of this subtype in relation to luminal A and luminal B HER2- neoplasms, reinforcing the importance of the classification of this subgroup among luminal neoplasms. The worse prognosis and shorter survival of the triple-negative phenotype compared to the luminal A are in agreement with previous studies that reported a shorter survival and an unfavorable prognosis in this group (Kim et al., 2013, Abadie et al., 2017). The absence of expression of hormonal markers, well established as a good prognostic factor, characterizes triple-negative subtypes as more aggressive neoplasms and worse clinical evolution. In the triple negative subtype the absence of expression ER and PR and probably the high degree of cellular indifferentiation may be contributing to the worse prognosis.

Multivariate analysis using a Cox proportional hazards model confirmed the relevance of clinical stage, presence of lymphatic invasion, and immunophenotypes. These results

reinforce the importance of complete clinical staging in CMCs. Araújo et al. (2016) observed that the presence of angiolymphatic invasion, high Ki67 rates and greater tumor size were associated with a shorter overall survival of female dog with mammary carcinomas. In addition, there have been reports of lower survival in animals with regional lymph node metastasis (stage IV) (Araújo et al., 2016) and of an association between the presence of distant metastases and a worse prognosis (stage V) (Yamagami et al., 1996; Karayanopoulou et al., 2005) female dog.

Complementary studies should be performed to evaluate the benefit of complementation with adjuvant treatments according to immunophenotype. Immunophenotypic classification is an important prognostic factor, but individualized target therapies for each immunophenotype are not yet used in veterinary oncology. In the present study, there was association between spayed reproductive status and luminal A and triple negative subtypes, which can be attributed the epidemiological characteristics of the population since most of the females were spayed. The expression of ER and PR is associated with cell differentiation and decreases progressively from hyperplastic/dysplastic lesions, benign neoplasms and malignant neoplasms compared to the normal mammary gland (Chang et al., 2005). In canine mammary tumors, the high expression of ER and PR suggests the possibility of using antiestrogen therapy (Tamoxifen). However, this drug has been associated with side effects such as vulvar edema, incontinence and urinary tract infection, endometritis, pyometra and ovarian cysts (Tavares et al., 2010). Given the absence of antiestrogenic drugs that can be administered in female dog, ovarioectomy (OHE) may be beneficial in inhibiting the action of hormonal stimulation in female dog with neoplasms with hormone receptor positives, as this would eliminate a source of hormonal stimulation for any remaining tumor cells. Another study showed that dogs with grade 2, ER– positive tumors as well as dogs with increased serum E2 level are likely to benefit from OHE (Kristiansen et al., 2016). The increases in Ki67 expression and the decrease in ER and PR expression suggest the necessity for adjuvant chemotherapy. The expression of HER2 was a negative prognostic factor, however therapies with anti-c-erbB2 monoclonal antibodies are not yet used in veterinary oncology. Complementary studies should be performed to evaluate the benefit of complementation with adjuvant treatments according to immunophenotype.

Conclusions

The application of the St Gallen classification allowed the identification of subtypes with different prognoses in canine mammary cancer. Among them, luminal B HER2 positive was the one with the worst outcome. The best prognosis was associated with the luminal A subtype. In addition to the immunophenotype, other factors prognosis independent features such as advanced clinical stage were important, which reinforces the importance of a good clinical examination and evaluation of the lymph nodes in canine mammary cancer.

Declaration of conflict of interest: None of the authors has financial or personal relationships that may influence or distort the content of the article.

Acknowledgments: The authors wish to thank the Minas Gerais State Research Foundation (FAPEMIG), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) of Brazil for financial support.

References

- Abadie, J., Nguyen, F., Loussouarn, D., Pena, L., Gama, A., Rieder, N., Belousov, A., Bemelmans, I., Jaillardon, L., Ibsch, C., Campone, M., 2017. Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 2: immunophenotypes and prognostic significance. *Breast Cancer Research and Treatment* 167, 459-468.
- Araújo, M.R., Campos, L.C., Damasceno, K.A., Gamba, C.O., Ferreira, E., Cassali, G.D., 2016. HER-2, EGFR, Cox-2 and Ki67 expression in lymph node metastasis of canine mammary carcinomas: Association with clinicopathological parameters and overall survival. *Research in Veterinary Science* 106, 121–130.
- Blows, F.M., Driver, K.E., Schmidt, M.K., Broeks, A., van Leeuwen, F.E., Wesseling, J., Cheang, M.C., Gelmon, K., Nielsen, T.O., Blomqvist, C., et al., 2010. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: A collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Medicine* 7,5.
- Cassali, G.D., Lavalle, G.E., Ferreira, E., Estrela-Lima, A., de Nardi, A.B., Ghever, C., Sobral, R.A., Amorim, R.L., Oliveira, L.O., Sueiro, F.A.R., et al., 2014. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors-2013. *Brazilian Journal of*

Veterinary Pathology 4, 153–180.

Cassali, G.D., Damasceno, K.A., Bertagnolli, A.C., Estrela-Lima, A., Lavallo, G.E., Di Santis, G.W., De Nardi, A.B., Fernandes, C.G., Cogliati, B., Sobral, R., et al., 2017. Consensus regarding the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors: Benign mixed tumors, carcinomas in mixed tumors and carcinosarcomas. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology* 10, 87-99.

Chang, S.C., Chang, C.C., Chang, T.J., Wong, M.L. 2005. Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 227, 1625-1629.

Dutra, A.P., Granja, N.V.M., Schmitt, F.C., Cassali, G.D., 2004. c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology* 37, 1673-1678.

Elston, C. W., Ellis, I. O., 1991. 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.

Estrela-Lima, A., Araújo, M.S., Costa-Neto, J.M., Teixeira-Carvalho, A., Barrouin-Melo, S.M., Cardoso, S.V., Martins-Filho, O.A., Serakides, R., Cassali, G.D., 2010. Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. *BMC Cancer* 10, 256-269.

Gama, A., Alves, A., Schmitt, F. 2008. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: Application of the human classification. *Virchows Archiv* 453, 123–132.

Goldhirsch, A., Wood, W.C., Coates, A.S., Gelber, R.D., Thurlimann, B., Senn, H.J., 2011. Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: Highlights of the St Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011. *Annals of Oncology* 22, 1736–1747.

Goldhirsch, A., Winer, E.P., Coates, A.S., Gelber, R.D., Piccart-Gebhart, M., Thurlimann, B., Senn, H.J., Albain, K.S., Andre, F., Bergh, J., Bonnefoi, H., et al., 2013. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: Highlights of the st gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast Cancer 2013. *Annals of Oncology* 24, 2206–2223.

Im, K.S., Kim, N.H., Lim, H.Y., Kim, H.W., Shin, J.I., Sur, J.H., 2014. Analysis of a New Histological and Molecular-Based Classification of Canine Mammary Neoplasia. *Veterinary*

Pathology 51, 549–559.

Karayannopoulou, M., Kaldrymidou, E., Constantinidis, T.C., Dessiris, A., 2005. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: Application of a human grading method. *Journal of Comparative Pathology* 133, 246–252.

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

Kim, N.H., Lim, H.Y., Im, K.S., Kim, J.H., Sur, J.H., 2013. Identification of Triple-negative and Basal-like Canine Mammary Carcinomas using Four Basal Markers. *Journal of Comparative Pathology* 148, 298–306.

Kristiansen, V.M., Pena, L., Diez Cordova, L., Illera, J.C., Skjerve, E., Breen, A.M., et al. 2016. Effect of ovariohysterectomy at the time of tumor removal in dogs with mammary carcinomas: a randomized controlled trial. *Journal Veterinary Internal Medicine* 30, 230–41.

Misdorp, W., Else, R.W., Hellme, N.E., Lipscomb, T.P., 1999. *Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat*, 2nd edn. Armed Forces Institute of Pathology, Washington D.C.

Nielsen, T.O., Hsu, F.D., Jensen, K., Cheang, M., Karaca, G., Hu, Z., Hernandez-Boussard, T., Livasy, C., Cowan, D., Dressler, L., Akslen, L.A., Ragaz, J., Gown, A.M., Gilks, C.B., Van De Rijn, M., Perou, C.M., 2004. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clinical Cancer Research* 10, 5367–5374.

Peña, L., Gama, a, Goldschmidt, M.H., Abadie, J., Benazzi, C., Castagnaro, M., Díez, L., Gärtner, F., Hellmén, E., Kiupel, M., Millán, Y., Miller, M. a, Nguyen, F., Poli, a, Sarli, G., Zappulli, V., de las Mulas, J.M., 2014. Canine mammary tumors: a review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. *Vetetrinary Pathology* 51, 127–45.

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

Rakha, E.A., Reis-Filho, J.S., Ellis, I.O., 2008. Basal-like breast cancer: A critical review. *Journal of Clinical Oncology* 26, 2568–2581.

Reis-Filho, J.S., Simpson, P.T., Turner, N.C., Lambros, M.B., Jones, C., Mackay, A., Grigoriadis, A., Sarrio, D., Savage, K., Dexter, T., Iravani, M., Fenwick, K., Weber, B.,

- Hardisson, D., Schmitt, F.C., Palacios, J., Lakhani, S.R., Ashworth, A., 2006. FGFR1 emerges as a potential therapeutic target for lobular breast carcinomas. *Clinical Cancer Research* 22, 6652-6662.
- Ribeiro, G.M., Bertagnolli, C., Rocha, R.M., Cassali, G.D., 2012. Morphological Aspects and Immunophenotypic Profiles of Mammary Carcinomas in Benign-Mixed Tumors of Female Dogs. *Veterinary Medicine International*, 2012, 7.
- Sassi, F., Benazzi, C., Castellani, G., Sarli, G., 2010. Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry.
- Soares, M., Madeira, S., Correia, J., Peleteiro, M., Cardoso, F., Ferreira, F., 2016. Molecular based subtyping of feline mammary carcinomas and clinicopathological characterization. *The Breast* 27, 44-51.
- Sorenmo, K.U., Worley, D.R., Goldschmidt, M.H., 2013. Tumors of the mammary gland. In: Withrow, S.J., Vail, D.M., Page, R.L. *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology, 5th Edition*. Saunders Elsevier, St. Louis, MO, USA. 538-556.
- Tavares, W.L.F, Lavalle, G.E., Figueiredo, M.S., Souza, A.G., Bertagnolli, A.C., Viana, F.A.B., Paes, P.R.O., Carneiro, R.A., Cavalcanti, G.A.O., Melo, M.M., Cassali, G.D., 2010. Evaluation of adverse effects in tamoxifen exposed healthy female dog. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 52-67.
- Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH et al. (2013) Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *Journal of Clinical Oncology* 138, 241–256.
- Yamagami, T., Kobayashi, T., Takahashi, K., Sugiyama, M., 1996. Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 58, 1079–1083.

ARTIGO 2

Expressão de ER, PR, Ki67 e COX-2 definem diferentes grupos com impacto no tratamento e na sobrevida específica em neoplasias mamárias caninas agressivas

Fernanda Camargo Nunes¹, Gleidice Eunice Lavallo², Angélica Cavalheiro Bertagnolli³, Miriã Rodrigues de Oliveira³, Stéfane Valgas Teixeira³, Geovanni Dantas Cassali¹

¹Laboratório de Patologia Comparada, Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil

²Hospital Veterinário, Escola de Veterinária, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil

³ Laboratório de Histopatologia, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural, Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária, Eldorado do Sul, Brasil

Resumo

O comportamento biológico de neoplasias mamárias caninas pode variar consideravelmente devido a sua grande heterogeneidade. Definir o prognóstico e prever a evolução clínica é um desafio para patologistas e oncologistas. Assim, o estudo de marcadores imuno-histoquímicos que forneçam um prognóstico assertivo e que sejam preditivos de resposta terapêutica é necessário. O objetivo deste estudo foi avaliar o valor coordenado da expressão de RE, RP, Ki67 e COX-2 em neoplasias mamárias caninas para obter subgrupos de imunoprognóstico. Além disso, o estudo objetivou avaliar a resposta terapêutica de acordo com a expressão desses marcadores. Foram incluídas 130 neoplasias mamárias caninas divididas em seis subgrupos imunoprognósticos de acordo com a expressão imuno-histoquímica para RE/RP, Ki67 e COX2. Melhor prognóstico com maior tempo de sobrevida foi associado as neoplasias com positividade para RE/RP, Ki67<20% e baixo escore de COX-2. Maior risco de óbito foi associado a neoplasias com RE/RP+, Ki67 >20% e alto escore de COX-2 (HR= 6.44, IC: 2.23-18.54, P=0.001) e RE/RP-, Ki67>20% e alto escore de COX-2 (HR=5.45, IC: 1.05-28.35, P=0.043). Terapia adjuvante foi realizada em 44% dos casos, com melhores respostas nos grupos de piores prognósticos como estadio avançado, RE/RP- com ki67 ou COX2

superexpresso (P=0.0310). A avaliação coordenada dos marcadores RE/RP, Ki67 e COX2 em neoplasias mamárias caninas contribuíram para categorizar as pacientes em diferentes grupos imunoprognósticos e para selecionar pacientes que se beneficiarão de terapias adjuvantes. Quimioterapia adjuvante e metronômica foram benéficas para aumentar a sobrevida de cadelas com altos riscos de óbito.

Palavras-chave: tumor, mama, cadelas, quimioterapia, metronômica

Introdução

Neoplasias de glândulas mamárias são comuns em cadelas não castradas (DOBSON et al., 2002). O comportamento biológico das neoplasias mamárias caninas (NMC) varia consideravelmente e pode ser influenciado por vários fatores clínico-patológicos como: tipo histológico, estágio clínico, tamanho do tumor, índice mitótico, grau histológico, metástase regional ou à distância e densidade microvascular (CASSALI et al., 2014; SORENMO, 2003). Reconhece-se também o uso de marcadores imuno-histoquímicos em NMC para fornecer o prognóstico e, em alguns casos informação preditiva de resposta ao tratamento (CASSALI et al., 2014).

A expressão de receptores de estrógeno e progesterona é geralmente relacionada ao melhor prognóstico em carcinomas mamários caninos (SORENMO, 2003). O aumento da expressão dos marcadores de proliferação celular e progressão tumoral, como o Ki67, HER-2 e EGFR, e o aumento da expressão de moléculas relacionadas ao ácido aracdônico como o COX-2 tem sido associados com pior prognóstico em cadelas com neoplasias mamárias (GAMA et al., 2009; LAVALLE et al., 2009; MARTÍN DE LAS MULAS et al., 2003; QUEIROGA et al., 2010). A presença desses marcadores de pior prognóstico geralmente resulta em menor tempo de sobrevida. Assim, a abordagem cirurgia não é suficiente para alcançar a cura, demonstrando a necessidade de terapias adjuvantes.

Terapias alvo para o tratamento do câncer de mama ainda não são utilizadas em oncologia veterinária, devido à falta de padronização de doses, avaliação de efeitos colaterais adversos e alto custos dos medicamentos. Nesse sentido, a determinação de fatores prognósticos que identifiquem pacientes que se beneficiarão de tratamentos complementares viáveis em oncologia veterinária é importante. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar a

expressão imuno-histoquímica de RE, RP, Ki67 e COX-2 em neoplasias mamárias caninas e categorizar subgrupos para avaliar a resposta terapêutica e a sobrevida específica.

Metodologia

Pacientes

Este estudo retrospectivo incluiu cadelas com neoplasias mamárias atendidas no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais, no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2016.

O estadió clínico foi obtido a partir de uma versão modificada do sistema TNM estabelecido pela Organização Mundial da Saúde para tumores mamários caninos, o qual avalia o tamanho do tumor primário (T), metástase linfonodal regional (N) e metástase à distância (M) (OWEN, 1980; SORENMO et al., 2011). Presença de metástases em linfonodos inguinais e/ou axilares foram confirmadas por meio de análise em hematoxilina e eosina (H&E) considerando-se como positividade a presença de células isoladas, micrometástases ou macrometástases. Para pesquisa de metástases em órgãos distantes, todas as cadelas foram submetidas a exames complementares de imagem como ultrassom abdominal e radiografias torácicas em três incidências (VD- ventro dorsal, LLD- latero lateral direita e LLE- latero lateral esquerda) no momento do diagnóstico e a cada três meses até completar dois anos de período pós-cirurgia.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes e após a aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (protocolo 366/2016).

Histologia

Os blocos de parafina foram recuperados do arquivo do Laboratório de Patologia Comparada do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Os tumores foram classificados de acordo com os critérios histológicos veterinários estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (MISDORP et al., 1999), com modificações propostas por (CASSALI et al. (2014). A neoplasia primária de pior prognóstico foi escolhida para a análise em cadelas com lesões múltiplas. O grau histológico foi obtido de acordo com ELSTON & ELLIS (1991). Os animais

incluídos no estudo apresentavam estadió clínico avançado com qualquer tipo histológico ou tipos histológicos agressivos como carcinomas sólidos, carcinomas micropapilares, carcinomas lobulares pleomórficos e carcinossarcomas independente do estadió clínico (CASSALI et al., 2014). Cadelas com outros tipos de câncer e casos cujos blocos de parafina não estavam viáveis para o estudo imuno-histoquímico foram excluídos.

Imuno-histoquímica

As reações imuno-histoquímicas foram realizadas em secções histológicas de 4µm pelo método do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase com um sistema comercial de detecção de anti-rato/anti-coelho (Novolink Polymer Detection System; Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, Reino Unido) de acordo com as instruções do fabricante. A recuperação antigênica para RE, RP, Ki67 e COX-2 foi realizada em calor-úmido pressurizado (Pascal®) com citrato pH 6,0 (DakoCytomation Target Retrieval Solution). Todas as secções foram incubadas com o anticorpo primário específico: RE (1:50, clone 1D5, Dako, Glostrup, Denmark), RP (1:50, hPRa2, Neomarkers, Fremont, CA), Ki67 (1:50, MIB-1, Dako, Dako, Glostrup, Denmark) e COX-2 (1:80, clone SP21, Thermo, Hemel Hempstead, UK) durante 16h em câmara úmida a 4°C. A imunorreatividade foi visualizada com o cromógeno diaminobenzidina (DAB Substrate System, Dako, Carpinteria, CA, EUA) e contra-corado com hematoxilina de Mayers. Secções de neoplasias mamárias com positividade previamente confirmada para RE, RP, Ki67 e COX-2 foram utilizadas como controles positivos. Para controles negativos o anticorpo primário foi substituído por solução salina tamponada com fosfato (PBS).

Quantificação da imunorreatividade

O índice de proliferação celular (Ki67) e a marcação para RE e RP foram calculados pela contagem manual do número de núcleos positivos em um total de 500 células neoplásicas em áreas de imagem de melhor marcação (zonas quentes) por meio de análise manual de imagens no software Image J (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA). Foram considerados positivos para RE e RP os casos com mais do que 10% das células neoplásicas marcadas. Para determinar o ponto de corte da marcação para Ki67 foi realizada uma análise univariada para avaliar a influência dos escores de 10%, 15% e 20% na sobrevida específica das cadelas com NMCs. Essa análise demonstrou que apenas o escore de 20% foi associado

com menor sobrevida específica e por isso esse valor foi utilizado como ponto de corte para classificar os casos com índice de proliferação alto e baixo.

A positividade para COX2 foi indicada pela marcação do citoplasma das células neoplásicas. A expressão de COX-2 foi determinada pelo sistema de escore semiquantitativo que considera a distribuição – porcentagem de células positivas em cinco campos 400x: 0 =ausência, 1= <10% de células positivas, 2= 10-30%, 3= 31-60% e 4= mais de 61%, e intensidade 0= ausência (-), 1 = fraco (+), 2= moderado (++) e 3= forte (+++). Os escores de distribuição e intensidade foram multiplicados para obtenção de um escore total, com variação de 0 a 12, com escore de 0 a 5 considerados baixo escore e de 6 a 12 como alto escore (LAVALLE et al., 2009).

Estratificação dos grupos de acordo com os imunoprognoticos:

Para categorização em grupos imunoprognoticos análise de sobrevida específica para cada marcador imuno-histoquímico foi realizada para avaliar o seu valor prognóstico, de forma isolada. A partir dessa avaliação prognóstica prévia, as neoplasias foram divididas em seis categorias distintas de acordo com a expressão coordenada dos marcadores RE, RP, Ki67 e COX-2 para definir os grupos de imunoprognoticos:

Grupo 1: RE/RP positivos (>10%), Ki67 baixo (<20%) e COX-2 baixo (escore 0 -5);

Grupo 2: RE/RP positivos (>10%), Ki67 alto (>20%) ou COX-2 superexpresso (escore de 6 – 12);

Grupo 3: RE/ RP positivos (>10%), Ki67 alto (>20%) e COX-2 superexpresso (escore de 6 – 12);

Grupo 4 - RE/RP negativos (<10%), ki67 baixo (<20%) ou COX-2 baixo (escore 0 – 5);

Grupo 5 - RE/RP negativos (<10%), Ki67 alto (>20%) ou COX-2 superexpresso (escore 6 – 12);

Grupo 6 - RE/RP negativo (<10%), Ki67 alto (>20%) e COX-2 superexpresso (escore 6 - 12).

Tratamento

Todas as cadelas foram submetidas à cirurgia como terapia inicial, incluindo mastectomia simples, mastectomia regional ou mastectomia unilateral considerando os princípios de

cirurgia oncológica, localização das lesões e drenagem linfática (Horta et al., 2014). Todos os tutores foram informados do prognóstico e a quimioterapia adjuvante foi recomendada para todas as pacientes, porém em alguns casos houve recusa pelos tutores. Nesses casos as pacientes foram tratadas exclusivamente por cirurgia.

As pacientes submetidas à quimioterapia adjuvante receberam quatro ciclos de carboplatina (300mg/m²) a cada 21 dias. Ao término do ciclo de quimioterapia adjuvante, pacientes com neoplasias com expressão elevada de COX-2 (escore de 6 – 12) foram submetidas à quimioterapia metronômica com ciclofosfamida na dose de 15mg/m² e firocoxibe (Previcox®) na dose de 5mg/kg, por via oral a cada 24 horas durante seis meses ou ininterruptamente em pacientes com metástases à distância.

A resposta clínica ao tratamento foi avaliada a cada 21 dias durante as sessões de quimioterapia, com base no exame físico com palpação no local da cicatriz cirúrgica para avaliar presença de recidivas. Após o término dos quatro ciclos de quimioterapia exames de imagem (radiografia torácica e ultrassom abdominal) foram realizados e repetidos a cada três meses até completar dois anos de acompanhamento.

Acompanhamento

Todas as pacientes foram acompanhadas por um período mínimo de dois anos (24 meses) para avaliar a sobrevivência específica (SS) definida como o tempo, em dias, entre a mastectomia e a morte causada pela progressão da doença com evidências de metástases em órgãos distantes e síndromes paraneoplásicas (anorexia/caquexia). Pacientes que morreram de causas não relacionadas ao câncer de mama foram censuradas na data do óbito. O tempo de início da observação para cada paciente (T₀) foi definido como a data da remoção cirúrgica do tumor mamário. Os pacientes foram acompanhados até dezembro de 2018.

Análise estatística

Inicialmente realizou-se análise descritiva por meio da distribuição de frequências das características clínicas, patológicas e dos marcadores imuno-histoquímicos. A avaliação coordenada dos marcadores imuno-histoquímicos foi utilizada para classificar as neoplasias de acordo com o perfil de expressão dos marcadores (grupos de imunoprognóstico).

As estimativas das curvas de sobrevida específica de acordo com os marcadores imunohistoquímicos (RE, RP, Ki67 e COX-2), com os parâmetros clínico-patológicos (idade, tamanho tumoral, estádio clínico, presença de invasão linfática, grau e tipo histológico) e grupos imunoprognósticos (1 a 6) em animais com neoplasias foram realizadas pelo método de Kaplan-Meier. O teste de Log-rank foi utilizado para comparação das curvas de sobrevida e considerou-se estatisticamente significativo os valores com $P < 0,05$.

A estimativa da sobrevida específica de acordo com a marcação de RE, RP, Ki67 e COX-2 foi calculada levando em consideração apenas as pacientes com estágio inicial (I-III) e tratadas somente por cirurgia para evitar interferências da evolução da doença e do tratamento na análise. Os tipos histológicos foram divididos em dois grupos de acordo com o potencial de agressividade: 1- carcinoma em tumor misto, carcinoma tubular e carcinoma papilar invasor, todos em estágio clínico IV-V; 2- carcinoma sólido, carcinoma micropapilar, carcinoma lobular pleomórfico e carcinossarcoma, independente do estágio clínico (CASSALI et al., 2014; NUNES et al., 2018).

Para identificação do efeito independente da idade ao diagnóstico, status reprodutivo, tamanho do tumor, estágio clínico, tipo histológico, invasão linfática, grau histológico e grupos de imunoprognóstico utilizou-se o modelo uni e multivariado de riscos proporcionais de Cox (Hazard ratio-HR), excluindo da análise cadelas submetidas a terapias adjuvantes. Foram incluídas nessa análise todas as variáveis que apresentaram $p < 0,05$ na análise de regressão de riscos proporcionais de Cox univariada. Para o ajuste do modelo, as variáveis foram excluídas uma a uma e o processo de eliminação das variáveis foi finalizado quando o valor de P de todas as variáveis do modelo foi menor do que 0,05.

Para avaliar o efeito da complementação terapêutica entre os animais com estágio inicial (I-III) e avançado (IV-V) foram realizadas análises univariadas de sobrevida específica entre as cadelas tratadas somente com cirurgia, cirurgia + quimioterapia e cirurgia + quimioterapia + quimioterapia metronômica.

Todas as análises foram realizadas no software Stata versão 14.0 e um valor de $P \leq 0,05$ foi considerado significativo.

Resultados

Características das pacientes e neoplasias

A idade média ao diagnóstico aos 10.97 ± 3.02 anos (amplitude de 3 a 21 anos). Os dados clínico-patológicos de cadelas com neoplasias mamárias estão descritos na tabela 1. A avaliação coordenada dos marcadores permitiu identificar seis grupos de imunoprognósticos (Tabela 2).

Tabela 1- Dados clínico-patológicos de cadelas com neoplasias mamárias malignas (n=130)

Variáveis	N	%
Idade		
<10 anos	54	42.9
> 10 anos	72	57.1
Status reprodutivo		
Castrada	39	39
Inteira	61	61
Uso de contraceptivos		
Não	64	88.9
Sim	8	11.1
Ciclo estral		
Regular	58	77.3
Irregular	17	22.7
Pseudociese		
Ausente	38	50
Presente	38	50
Estadio clínico		
I-III	45	35.1
IV-V	83	64.9
Tamanho		
T ₁ < 3.0 cm	30	24.1
T ₂ 3.0 - 5.0 cm	19	15.3
T ₃ > 5.0 cm	75	60.6
Prognóstico		

Bom	44	33.8
Ruim	86	66.2
Tipo histológico		
Adenomioepitelioma maligno	7	5.4
Carcinoma em tumor misto	24	18.5
Carcinoma papilar invasor	8	6.1
Carcinoma tubular	5	3.9
Carcinoma sólido	37	28.5
Carcinossarcoma	19	14.6
Carcinoma lobular pleomórfico	3	2.3
Carcinoma micropapilar	27	20.7
Invasão linfática		
Ausente	76	65.5
Presente	40	34.5
Grau histológico		
I	13	15.6
II	38	45.8
III	32	38.5
Receptor de estrógeno		
Negativo <10%	75	57.7
Positivo >10%	55	42.3
Receptor de progesterona		
Negativo <10%	19	14.6
Positivo >10%	111	85.4
Índice de proliferação celular (Ki67)		
Baixo Ki67 <20%	54	41.5
Alto Ki67 >20%	76	58.5
Cicloxigenase 2 (COX-2)		
COX-2 Baixo (1-5)	73	56.1
COX-2 Alto (6-12)	57	43.9

Tabela 2 – Distribuição da frequência das neoplasias mamárias caninas em grupos de imunoprognóstico

Grupos	RE/RP	Ki67		COX-2	N (%)
1	+	<20%		Baixo	31 (23.8)
2	+	>20%	Ou	Alto	50 (38.5)
3	+	> 20%		Alto	33 (25.4)
4	-	<20%		Baixo	2 (1.5)
5	-	>20%	Ou	Alto	9 (6.9)
6	-	> 20%		Alto	5 (3.8)

Sobrevida específica

Entre as cadelas com estadio inicial (I—III) foi observado menor tempo de sobrevida em pacientes com neoplasias positivas para RE em relação às negativas (P=0.0412). Neoplasias com positividade para RP apresentaram melhor prognóstico com maior tempo de sobrevida (não atingem a mediana) em relação às cadelas com receptores negativos para progesterona (mediana aos 78 dias) (P=0.0346). Alta expressão de Ki67 e alto escore de COX-2 contribuíram para menor tempo de sobrevida específica em relação à ki67<20% e baixo escore de COX-2 (P= 0.0129 e 0.0082, respectivamente).

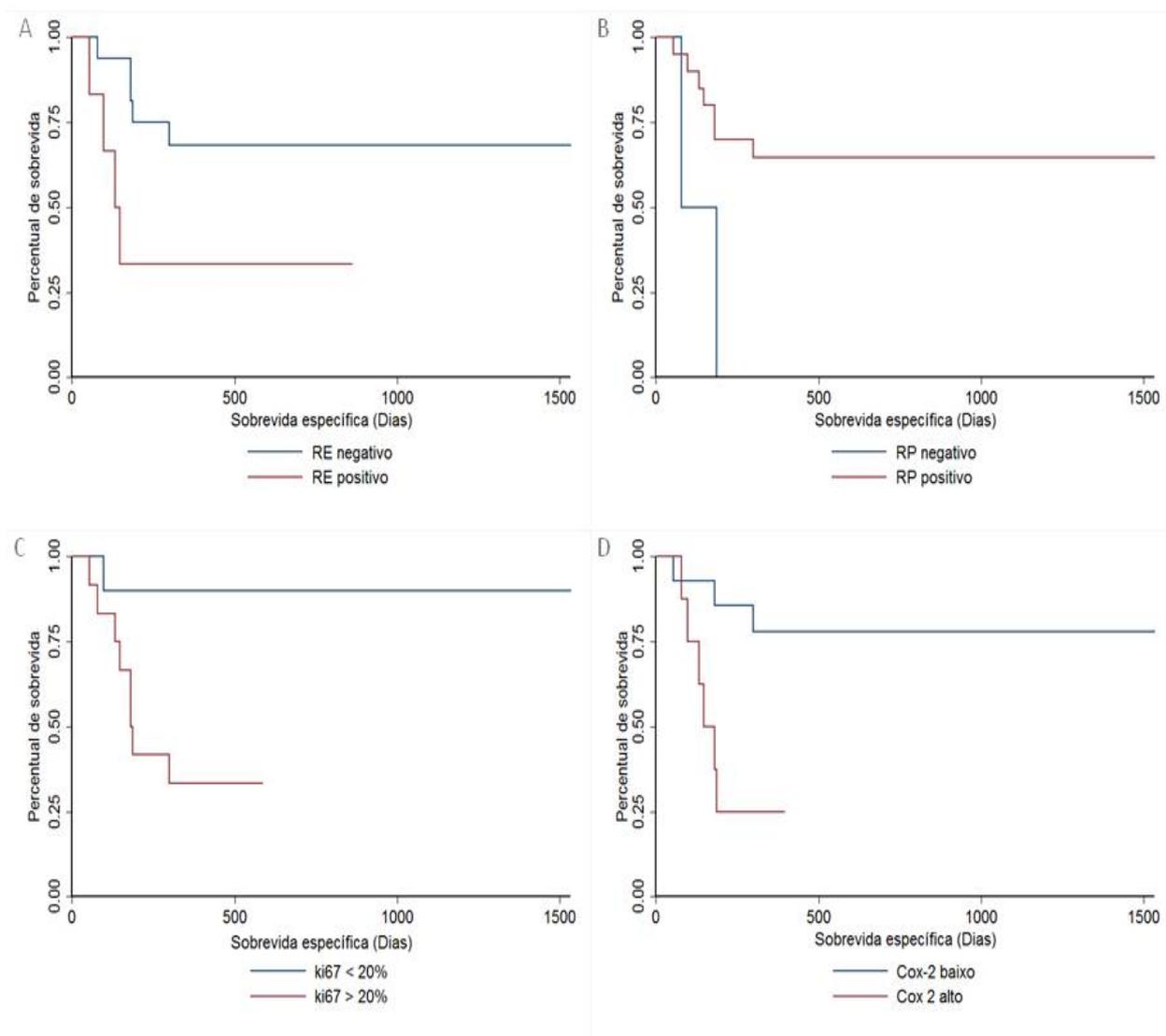


Figura 1- Curva de sobrevivida específica de Kaplan-Meier de cadelas com neoplasias mamárias em estadio I-III de acordo com marcadores imuno-histoquímicos: A – Receptores de estrógeno ($P=0.0412$) negativo não atinge a mediana ($n=17$) e positivo mediana aos 132 dias ($n=6$); B- Receptores de progesterona negativo mediana aos 78 dias ($n=6$) e positivo não atinge a mediana ($P=0.0346$) ($n=21$), C- Índice de proliferação celular Ki67 ($P= 0.0129$) baixo não atinge a mediana ($n=11$) e alto mediana aos 180 dias ($n=12$). D- Cicloxigenase- 2 (0.0082) baixo não atinge a mediana ($n=14$) e alto mediana aos 147 dias ($n=9$).

Na avaliação de sobrevivida específica entre os grupos foi observado maior tempo de sobrevivida em cadelas do grupo 1 (RE/RP+, Ki67<20% e COX-2 baixo) com relação aos demais grupos ($P= 0.0125$). As cadelas com neoplasias negativas para RE/RP, Ki67>20% e COX2

superexpresso (grupo 6) apresentaram menor tempo de sobrevida. Devido ao baixo número de casos não foi possível avaliar a relação entre o grupo 4 (apenas uma cadela tratada somente por cirurgia) e os demais grupos na curva de sobrevida específica.

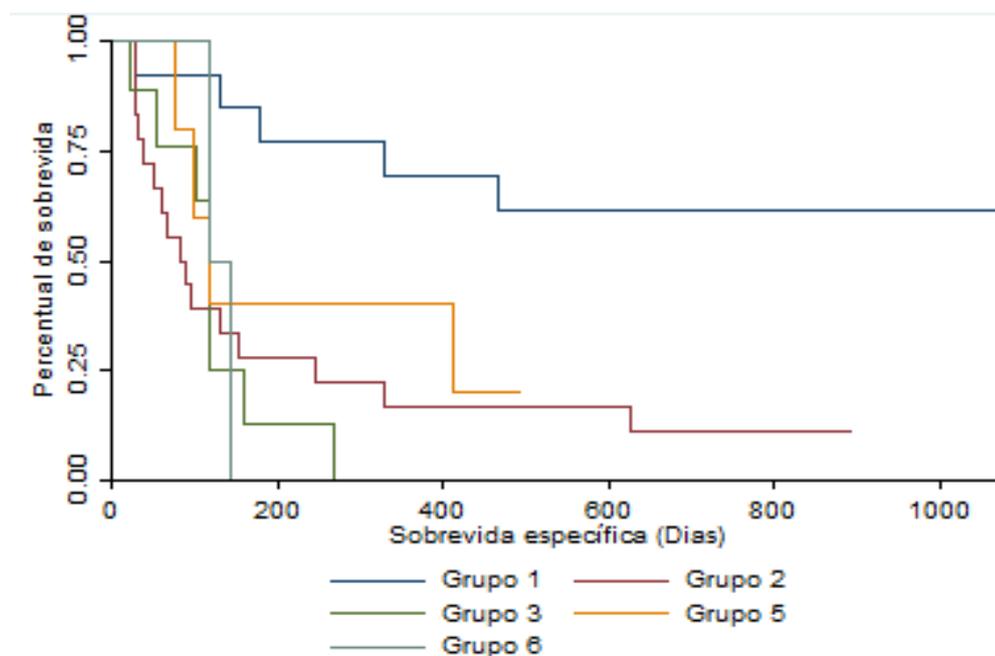


Figura 2- Curva de sobrevida de cadelas com neoplasias mamárias caninas de acordo com subtipos prognóstico de expressão de RE/RP, Ki67 e COX-2. Grupo 1: RE/RP+, Ki67<20% e COX-2 de escore baixo (1-5), n=20, não atinge a mediana; Grupo 2: RE/RP+, Ki67>20% ou COX-2 elevado, n=28, mediana de 153 dias; Grupo 3: RE/RP+, Ki67> 20% e COX-2 alto (6-12), n=14, mediana de 147 dias; Grupo 5: RE/RP-, Ki67<20% e COX-2 baixo, n=9, mediana aos 187 dias; Grupo 6: RE/RP-, Ki67>20% e COX-2 elevado (6-12), n=2, mediana aos 120 dias (P= 0.0125).

Na análise univariada de sobrevida específica (Log-rank) fatores prognósticos como idade (P=0.7511), status reprodutivo (P=0.817) e tamanho do tumor primário (P=0.827) não apresentaram associação significativa com a sobrevida específica. Menor tempo de sobrevida específica foi associado significativamente com estágio clínico avançado (IV-V) (P=0.002), neoplasias com alto potencial de agressividade (P=0.0002), alto grau histológico (II-III) (P=0.047), presença de invasão linfática (P<0.0001) e os grupos de imunoprogóstico (P= 0.012) com o grupo 6 apresentando maior risco em relação ao grupo 1.

A tabela 3 apresenta a relação de risco de óbito (HR) das variáveis com impacto no tempo de sobrevida de cadelas tratadas somente com cirurgia. Estádio clínico avançado apresentou um risco de óbito de HR=3.34 (IC= 1.47-7.57, P=0.004) em relação ao estágio inicial. Diagnósticos de tipos histológicos com alto potencial de agressividade como carcinoma lobular pleomórfico, carcinoma sólido, carcinoma micropapilar e carcinosarcoma resultaram em um HR=4.52 (IC= 1.88-10.88, P=0.001) em relação às neoplasias de menor potencial de agressividade em estágio clínico avançado (carcinoma em tumor misto, carcinoma papilar invasor, carcinoma tubular). Presença de invasão linfática e alto grau histológico apresentaram riscos de 3.93 e 2.06 (IC=2.03-7.60 P=0.0001; IC=1.14-3.74, P=0.017), respectivamente. Maior risco de óbito foi associado ao grupo 6 (RE/RP-, Ki67>20% e COX-2 alto) em relação as neoplasias com RE/RP+, Ki67 <20% e COX2 baixo. Em análise multivariada estágio clínico e os subgrupos permaneceram no modelo final.

Tabela 3- Análise uni e multivariada de sobrevida específica de cadelas com neoplasias mamária, tratadas somente com cirurgia (n=73)

Variáveis	ANÁLISE UNIVARIADA		
	HR	IC	P valor
Idade			
<10 anos <i>versus</i> > 10 anos	1.10	0.58-2.10	0.754
Status reprodutivo			
Castrada <i>versus</i> Inteira	0.90	0.40-2.05	0.819
Estadio clínico			
I-III <i>versus</i> IV-V	3.34	1.47-7.57	0.004
Tamanho tumoral			
T ₁ <i>versus</i> T ₂ -T ₃	1.37	0.68-2.77	0.366
Potencial de agressividade			
Baixo <i>versus</i> Alto	4.52	1.88-10.88	0.001
Invasão linfática			
Ausente <i>versus</i> Presente	3.93	2.03-7.60	0.0001
Grau histológico			
I <i>versus</i> II-III	2.06	1.14-3.74	0.017
Grupos			

Grupo 2 <i>versus</i> grupo 1	3.59	1.42-9.09	0.007
Grupo 3 <i>versus</i> grupo 1	4.98	1.77-14.03	0.002
Grupo 4 <i>versus</i> grupo 1	3.04	0.97-9.49	0.055
Grupo 6 <i>versus</i> grupo 1	6.52	1.27-33.45	0.025

Variáveis	ANÁLISE MULTIVARIADA		
	HR	IC	P valor
Estádio clínico			
I-III <i>versus</i> IV-V	4.09	1.78-9.38	0.001
Subgrupos			
Grupo 2 <i>versus</i> grupo 1	4.21	1.63-10.88	0.003
Grupo 3 <i>versus</i> grupo 1	6.44	2.23-18.54	0.001
Grupo 4 <i>versus</i> grupo 1	3.78	1.20-11.87	0.022
Grupo 6 <i>versus</i> grupo 1	5.45	1.05-28.35	0.043

Sobrevida específica de acordo com o tratamento e estágio clínico

Cinquenta e sete (43%) cadelas foram submetidas a terapias complementares após mastectomia, dessas trinta e seis (28%) foram tratadas com quimioterapia adjuvante e vinte e uma (15%) receberam quimioterapia adjuvante e metronômica. Ao término do período de acompanhamento 26 (20%) das pacientes estavam vivas, 30 (23%) foram censuradas e 74 (57%) cadelas morreram devido à progressão da doença, com um tempo médio de acompanhamento de 417 dias (intervalo 96 - 2089 dias).

Os diferentes tipos de tratamento não influenciaram o tempo de sobrevida específica das cadelas com estágio inicial do grupo 1 (RE/RP+, Ki67 <20% e COX-2 de baixo escore) (P= 0.9519) (Fig. 3A). Cadelas com neoplasias em estágio inicial e com RE/RP+, Ki67>20% ou COX2 superexpresso (Grupo 2) tratadas com terapias adjuvantes apresentaram melhor desfecho com maior tempo de sobrevida em relação às cadelas tratadas somente com cirurgia, porém sem diferença significativa (P= 0.5274) (Fig. 3C). Grupo 3 em estágio inicial apresentou menor tempo de sobrevida quando tratados somente por cirurgia (mediana aos 180 dias) em relação ao tratamento com cirurgia + quimioterapia (mediana aos 242 dias) e cirurgia + quimioterapia+ metronômica (não atinge a mediana) (P=0.4083); (Fig 3E). Nenhuma cadela em estágio inicial do grupo 4 (RE/RP-, Ki67<20% e baixo escore de COX2) recebeu terapia complementar, o tempo médio de sobrevida dessas pacientes foi de 394,5 dias

(mínimo 98 e máximo de 730 dias). No grupo 5 e 6 não havia nenhuma cadela em estadio inicial.

Em estadio clínico avançado as cadelas com neoplasias RE/RP+, Ki67 <20% e escore de COX-2 baixo (Grupo 1) não atingiram a mediana de sobrevida específica independente da abordagem terapêutica (P=0.8596) (Fig. 3B). No grupo 2 (RE/RP+ com Ki67>20% ou COX2 superexpresso), cadelas tratadas somente com cirurgia apresentaram mediana de 84 dias em relação as cadelas tratadas com quimioterapia adjuvante (mediana aos 207 dias) e quimioterapia adjuvante + quimioterapia metronômica (mediana de 314 dias) (P=0.2358) (Fig. 3D). Cadelas com neoplasias RE/RP+, Ki67>20% e COX-2 superexpresso (Grupo 3) apresentaram maior tempo de sobrevida específica quando submetidas a quimioterapia metronômica (não atingem a mediana) em relação a cirurgia (120 dias) ou cirurgia e quimioterapia (145 dias) (P=0.0045). Neoplasias com receptores hormonais negativos com Ki67>20% ou COX-2 superexpresso (Grupo 4) apresentaram significativamente (P=0.0310) maior tempo de sobrevida quando submetidas a quimioterapia adjuvante (não atingem a mediana) ou quimioterapia metronômica (mediana aos 431 dias) em relação as cadelas tratadas somente com cirurgia (mediana aos 98 dias). Duas cadelas do grupo 5 (RE/RP-, Ki67>20% ou COX2 superexpresso) apresentavam estadio avançado, uma delas tratada somente com cirurgia apresentou uma sobrevida de 180 dias a outra paciente foi submetida a quimioterapia adjuvante estava viva após 730 dias de acompanhamento. Duas cadelas foram inseridas no grupo 6 (RE/RP-, Ki67>20% e escore elevado de COX-2), e a média de sobrevida foi de 120 dias, tratadas somente com cirurgia.

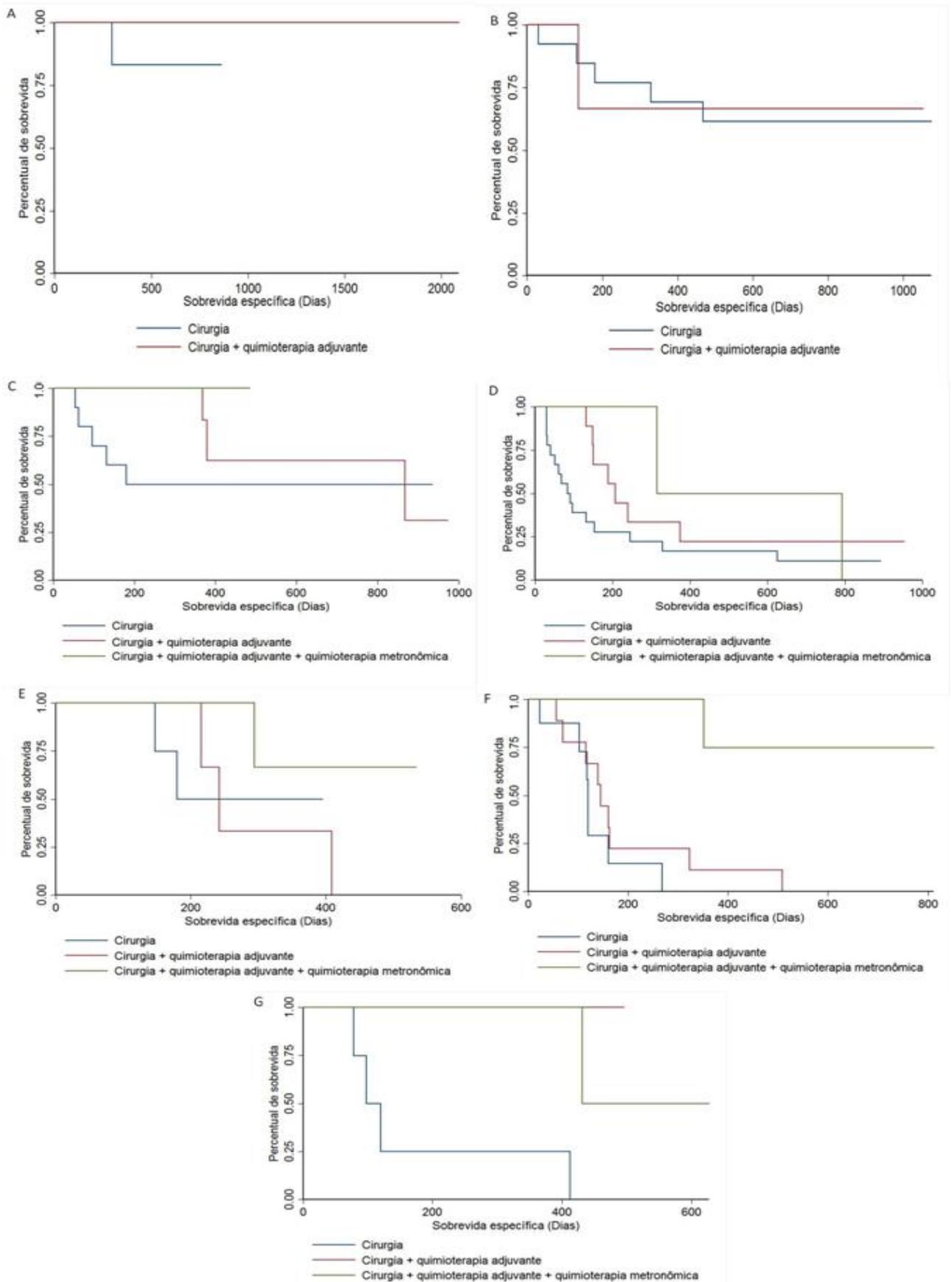


Figura 3- Curva de sobrevida de subtipos prognóstico de expressão de RE/RP, Ki67 e COX-2 de acordo com o tratamento e estágio clínico. **A-** Grupo 1 em estágio inicial: cirurgia, cirurgia + quimioterapia e cirurgia + quimioterapia + metronômica não atingem a mediana (P=0.9519); **B-** Grupo 1 em estágio avançado: cirurgia, cirurgia + quimioterapia e cirurgia + quimioterapia + metronômica não atingem a mediana (P=0.859); **C-** Grupo 2 em estágio inicial: cirurgia mediana aos 180; cirurgia + quimioterapia: mediana aos 868 dias; cirurgia + quimioterapia e quimioterapia metronômica: não atinge a mediana (P=0.527) **D-** Grupo 2 em estágio avançado: cirurgia 84 dias, cirurgia + quimioterapia 207 dias e cirurgia + quimioterapia e quimioterapia metronômica 314 dias (P=0.235) **E-** Grupo 3 em estágio inicial cirurgia: 180 dias cirurgia + quimioterapia: 242 dias cirurgia + quimioterapia+ metronômica: não atinge a mediana (P=0.408); **F-** Grupo 3 em estágio avançado: Cirurgia mediana aos 120 dias, cirurgia + quimioterapia mediana aos 145 dias; cirurgia + quimioterapia + metronômica: não atinge a mediana; (P=0.004) **G-** Grupo 4 em estágio avançado: Cirurgia mediana aos 98 dias, cirurgia + quimioterapia mediana aos 431 dias; cirurgia + quimioterapia + metronômica: não atinge a mediana (P=0.031)

Discussão

A evolução clínica das neoplasias mamárias caninas é muito variável, tornando importante a identificação de fatores de prognósticos que permitam estabelecer uma melhor caracterização das neoplasias. Diversos estudos apontam uma variação significativa no percentual de positividade para receptores hormonais em neoplasias mamárias malignas de cadelas, com uma variação de 10 a 92.3% para RE (CHANG et al., 2009; ILLERA et al., 2006; MARTÍN DE LAS MULAS; MILLÁN; DIOS, 2005; MILLANTA et al., 2005; YANG et al., 2006) e de 23.1 a 71.9% para RP (CHANG et al., 2009; MARTÍN DE LAS MULAS; MILLÁN; DIOS, 2005; MILLANTA et al., 2005). Corroborando com os resultados encontrados no presente estudo, no qual uma proporção de 43% de neoplasias positivas para RE e de 86% para RP foi observada. Os hormônios esteroides, estrógeno e progesterona, representam o principal fator de risco para o desenvolvimento de tumores mamários. O efeito proliferativo desses hormônios sob o epitélio ocorrem repetidamente em cada ciclo estral e o risco de desenvolvimento de neoplasias mamárias é determinado pela intensidade e duração da exposição do epitélio mamário à ação conjunta de estrógeno e prolactina (QUEIROGA et al., 2005; RUTTEMAN, BLANKENSTEIN, MINKE, & MISDORP, 1991; SORENMO et al., 2013).

Corroborando com estudos prévios (MILLANTA et al., 2005; CHANG et al., 2009), um maior tempo de sobrevida foi observado em cadelas com neoplasias RP+. Em mulheres com câncer de mama positivo para receptores hormonais, o tratamento com tamoxifeno melhora a sobrevida (GOLDHIRSCH et al., 2013). No entanto, em medicina veterinária a terapia antiestrogênica resultou no aparecimento de diversos efeitos colaterais como edema vulvar, incontinência e infecção do trato urinário, endometrite, piometra e cistos ovarianos (TAVARES et al., 2010). Assim, a ovariosterectomia (OHE) pode ser benéfica para inibir a ação da estimulação hormonal em cadelas com neoplasias com receptores hormonais positivos, pois isso eliminaria uma fonte de estimulação hormonal para quaisquer células tumorais remanescentes.

Em cadelas com tumores mamários, os estudos mostram pontos de corte distintos para Ki67 (PEÑA et al., 1998; SARLI et al., 2002; SANTOS et al., 2013; ABADIE et al., 2017). No presente estudo, um ponto de corte de 20% apresentou impacto significativo no tempo de sobrevida específica. PENÃ et al (1998) mostraram que altos valores de Ki67 (>24%) estavam associados com presença de metástase linfonodal, pior sobrevida e menor tempo livre de doença. FERREIRA et al (2009) observaram que altos valores de Ki67 estavam associados com tumores maiores que 5.0 cm. Outro estudo, com um ponto de corte de 40% de células positivas para Ki67, mostrou que o alto índice de proliferação celular (Ki67 >40%) estava associado com menor tempo livre de doença e pior sobrevida (SANTOS et al., 2013). Na medicina humana, a alta expressão de Ki-67 em células neoplásicas está correlacionada com prognóstico ruim, mas, ao mesmo tempo, foi demonstrado que pacientes com alto Ki-67 responderam bem à quimioterapia, provavelmente devido à alta atividade proliferativa (TOKUDA et al., 2017). No presente estudo, cadelas com neoplasias com alto Ki67 apresentaram pior prognóstico, porém melhor evolução clínica foi observada quando houve associação de terapias (quimioterapia adjuvante + quimioterapia metronômica). Esses achados reforçam o tratamento do câncer de cadelas deve incluir terapias multimodais.

Os carcinomas micropapilares, sólidos, tubulares e carcinosarcomas apresentam uma menor sobrevida global quando comparados aos carcinomas em tumores mistos e carcinomas papilares (NUNES, 2014; NUNES et al., 2019). No presente estudo, demonstramos um maior risco de óbito associado a esses tipos histológicos, evidenciando que o tipo histológico é um fator prognóstico em neoplasias mamárias caninas. Eevidenciamos um maior risco de óbito

associado ao grupo de imunoprognoóstico com receptores hormonais negativos, $ki67 > 20$ e alta expressão de COX-2. A avaliação da expressão coordenada desses marcadores resulta em uma melhor definição do prognóstico, visto que a presença de mais de um fator prognóstico negativo apresenta um grande impacto na sobrevida de cadelas com neoplasias mamárias. De acordo com a literatura, a expressão de receptores hormonais diminui progressivamente a partir de lesões hiperplásicas/displásicas, neoplasias benignas e neoplasias malignas em comparação com a mama normal (CHANG et al., 2009). HELLER et al (2005) mostraram que expressão aumentada de Cox-2 estava associada a tipos histológicos agressivos, como os carcinomas anaplásicos de cadelas. LAVALLE et al (2009) observaram que a alta expressão de Cox-2 em neoplasias mamárias caninas estava associada a pior prognóstico e menor tempo de sobrevida. De forma isolada a alta expressão de COX-2 demonstra um impacto na sobrevida de cadelas com neoplasias mamárias, resultados semelhantes são descritos por LAVALLE et al., (2012). Inibidores de COX-2 como firocoxibe são usados no tratamento de tumores mamários caninos que expressam COX-2, (LAVALLE et al., 2009). A combinação de terapias mostrou ser benéfica para as cadelas com alta expressão de COX-2, índice elevado de Ki67 e em estadió clínico avançado, portanto com pior prognóstico, levando a um aumento na sobrevida das pacientes em comparação com o tratamento cirúrgico isolado. Resultados semelhantes foram reportados por DE CAMPOS et al., 2018, que demonstraram benefício clínico para pacientes em estágios clínicos avançados com terapia multimodal, incluindo terapias antiangiogênicas e imunomoduladoras.

O estádio clínico teve um importante valor prognóstico. Um estudo prévio comparou a sobrevida de animais tratados com diferentes terapias adjuvantes e aqueles tratados apenas com cirurgia, verificando que pacientes com estadió clínico avançado se beneficiam da terapia complementar (LAVALLE et al., 2012). No presente estudo, não foi observado benefício da complementação terapêutica em cadelas em estadió inicial o que pode ser justificado pela associação com fatores de bom prognóstico.

Quimioterápicos citotóxicos convencionais, em dose máxima tolerada (DMT) causam danos diretos ao DNA celular durante o seu ciclo de divisão celular para destruir o máximo possível de células neoplásicas (HANAHAN; BERGERS; BERGSLAND, 2000). A combinação de estratégias antiangiogênicas com protocolos de quimioterapia em DMT são associados a benefícios clínicos no tratamento de tumores malignos (PIERINI et al., 2012). Além disso,

tratamentos com agentes únicos são geralmente considerados menos eficazes quando comparado aos tratamentos multimodais (EHRKE, 2003). Nesse sentido, evidenciamos que a associação de protocolos convencionais com quimioterapia metronômica contribuiu para uma melhor evolução clínica e maior tempo de sobrevida, esses resultados promissores muito provavelmente ocorreram em decorrência do efeito antiangiogênico. A expressão da COX-2 não está somente confinada ao componente epitelial do tumor; existe uma relação linear significativa entre a neovascularização e a expressão aumentada da COX-2 (DAVIES et al., 2003). Com essas evidências, ressaltamos a importância do estudo da expressão de COX-2 para fundamentar a indicação de terapia metronômica em casos de escore elevado (6-12). A quimioterapia metronômica além de apresentar uma ação citotóxica direta, devido à exposição contínua das células cancerígenas aos fármacos, inibe a angiogênese tumoral, a qual é um processo crítico para o desenvolvimento, progressão e metástases das neoplasias (HANAHAN; BERGERS; BERGSLAND, 2000).

Como limitações no presente estudo não foi possível avaliar o benefício do tratamento em todos os grupos devido a baixa frequência de neoplasias RE/RP-. Entretanto, como contribuição o estudo demonstrou que a avaliação coordenada dos marcadores RE, RP, Ki67 e COX2 foi uma importante ferramenta para a categorização de cadelas com neoplasias mamárias em subgrupos de imunoprognóstico. Além disso, o estudo desses marcadores imunoprognósticos pode contribuir para a indicação de complementação terapêutica em cadelas com câncer de mama.

Conclusão

O estudo permitiu categorizar cadelas com neoplasias mamárias em diferentes grupos prognósticos com implicações terapêuticas. Neoplasias com receptores hormonais negativos, ki67>20% e escore 6-12 de COX-2 apresentaram pior prognóstico em comparação com os demais grupos avaliados. Protocolos de quimioterapia e quimioterapia metronômica são benéficos para cadelas com doença metastática.

Referências

ABADIE, J., NGUYEN, F., LOUSSOUARN, D., PENA, L., GAMA, A., RIEDER, N., BELOUSOV, A., BEMELMANS, I., JAILLARDON, L., IBISCH, C., CAMPONE, M., 2017. Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 2: immunophenotypes and prognostic significance. **Breast Cancer Research and Treatment** 167, 459-468

- CASSALI, G. D. et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 4, n. 2, p. 153–180, 2014.
- CHANG, C.-C. et al. Evaluation of hormone receptor expression for use in predicting survival of female dogs with malignant mammary gland tumors. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 2009.
- DAVIES, G. et al. Correlation between cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in human breast cancer. **Clinical Cancer Research**, 2003.
- DE CAMPOS, C. B. et al. Adjuvant thalidomide and metronomic chemotherapy for the treatment of canine malignant mammary gland neoplasms. **In Vivo**, 2018.
- DOBSON, J. M. et al. Canine neoplasia in the UK: Estimates of incidence rates from a population of insured dogs. **Journal of Small Animal Practice**, 2002.
- 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**, v. 19, n. 5, p. 403–410, 1991
- FERREIRA, E. et al. The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 7, n. 4, p. 230–235, 2009.
- GAMA, A. et al. Immunohistochemical expression of Epidermal Growth Factor Receptor EGFR in canine mammary tissues. **Research in Veterinary Science**, 2009
- GOLDHIRSCH, A. et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: Highlights of the st gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast Cancer 2013. **Annals of Oncology**, v. 24, n. 9, p. 2206–2223, 2013.
- HANAHAN, D.; BERGERS, G.; BERGSLAND, E. **Less is, more, regularly: Metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice** **Journal of Clinical Investigation**, 2000.
- HELLER, D. A.; CLIFFORD, C. A.; GOLDSCHMIDT, M. H. et al. Cyclooxygenase-2 expression is associated with histologic tumor type in canine mammary carcinoma. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 6, p. 776-780, 2005.
- HORTA, R. D. S. Influence of Surgical Technique on Overall Survival, Disease Free Interval and New Lesion Development Interval in Dogs with Mammary Tumors. **Advances in Breast Cancer Research**, v. 3, n. April, p. 38–46, 2014.
- ILLERA, J. C. et al. Steroids and receptors in canine mammary cancer. **Steroids**, 2006
- LAVALLE, G. E. et al. Canine malignant mammary gland neoplasms with advanced clinical staging treated with carboplatin and cyclooxygenase inhibitors. **In Vivo**, v. 26, n. 3, p. 375–379, 2012.
- LAVALLE, G. E. et al. Cox-2 expression in canine mammary carcinomas: correlation with angiogenesis and overall survival. **Veterinary pathology**, v. 46, n. 6, p. 1275–80, 2009

MARTÍN DE LAS MULAS, J. et al. Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas: An immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. **Breast Cancer Research and Treatment**, 2003

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**, 2005

MILLANTA, F. et al. Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. **Research in Veterinary Science**, 2005.

MISDORP W, ELSE RW, HELLMEN E. Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat. Geneva, Switzerland: **World Health Organization**; 1999.

NUNES, F. C. et al. Analysis of clinico-pathological data, therapeutical conduct and overall survival of canine mammary lesions attended at the veterinary hospital of the Federal University of Minas Gerais (UFMG). **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 7, n. 2, p. 122–126, 2014.

NUNES, F. C. et al. Mixed tumors of the canine mammary glands: Evaluation of prognostic factors, treatment, and overall survival. **Veterinary and Animal Science**, 2019.

OWEN, L. TNM Classification of tumours in domestic animals. **World Health Organisation**, p. 1–52, 1980.

PEÑA, L.L., NIETO, A.I., PÉREZ-ALENZA, D., CUESTA, P., CASTAÑO, M., 1998. 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.

PIERINI, A. et al. From humans to dogs and back: The translational lesson of metronomic chemotherapy. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v. 7, n. 4, p. 198–212, 2012.

QUEIROGA, F. L. et al. Cox-2 levels in canine mammary tumors, including inflammatory mammary carcinoma: Clinicopathological features and prognostic significance. **Anticancer Research**, 2005

QUEIROGA, F. L. et al. The role of Cox-2 expression in the prognosis of dogs with malignant mammary tumours. **Research in Veterinary Science**, 2010.

RUTTEMAN, G. R. et al. Steroid receptors in mammary tumours of the cat. **Acta Endocrinol Copenh**, 1991.

SANTOS, A.A., LOPES, C.C., RIBEIRO, J.R., MARTINS, L.R., SANTOS, J.C., AMORIN, I.F., GÄRTNER, F., MATOS, A.J., 2013. Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. **BMC Veterinary Research** 9, 1

SARLI, G. et al. Prognostic value of histological stage and proliferative activity in canine

malignant mammary tumors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 14, p. 24–32, 2002

SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 33, n. 3, p. 573–96, 2003

SORENMO, K. U. et al. Development, Anatomy, Histology, Lymphatic Drainage, Clinical Features, and Cell Differentiation Markers of Canine Mammary Gland Neoplasms. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 85–97, 2011.

SORENMO, K. U.; WORLEY, D. R.; GOLDSCHMIDT, M. H. Tumors of the Mammary Gland. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN'S, E. G. *Small clinical veterinary oncology*. 5th. ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2013. p. 538-556.

TAVARES, W. L. et al. Evaluation of adverse effects in tamoxifen exposed healthy female dogs. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 52, n. 1, p. 67, 2010

TOKUDA, E. et al. Differences in Ki67 expressions between pre- and post-neoadjuvant chemotherapy specimens might predict early recurrence of breast cancer. **Human Pathology**, 2017

YANG, W. Y. et al. Proliferative activity, apoptosis and expression of oestrogen receptor and Bcl-2 oncoprotein in canine mammary gland tumours. **Journal of Comparative Pathology**, 2006.

8. CONCLUSÕES GERAIS

- O estudo imuno-histoquímico com a determinação dos marcadores RE, RP, Ki67, HER2, EGFR e CK5/6 permitiu a identificação dos subtipos luminal A, luminal B HER2-, luminal B HER2+ e triplo negativo em neoplasias mamárias caninas;
- O escore de ki67 > 20% permitiu estabelecer um valor prognóstico para diferenciação entre neoplasias luminal A e luminal B HER2-;
- Na análise uni e multivariada os subtipos luminal A, luminal BHER2-, luminal B HER2+ e triplo negativo foram variáveis significantes que influenciaram na sobrevida, observando-se que o subtipo luminal B HER2+ demonstrou maior risco de óbito.
- Os subtipos luminais apresentaram frequência elevada, o que está de acordo com o descrito para o câncer de mama na mulher e alguns estudos em medicina veterinária;
- O subtipo luminal A apresenta melhor prognóstico com maior tempo de sobrevida (SS, DFI, OS) em relação aos demais imunofenótipos;
- Neoplasias de melhor prognóstico, como carcinoma em tumor misto, são com maior frequência associadas ao subtipo luminal A;
- Fatores de bom prognóstico como baixo grau histológico, estágio clínico inicial, ausência de invasão linfática e tipos histológicos não agressivos são mais frequentes em neoplasias luminais.
- Cadelas com neoplasia luminal A apresentam menor risco de óbito em relação aos demais subtipos imunofenotípos;
- Luminal B HER2- é o subtipo mais frequente
- Luminal B HER2+ apresenta pior prognóstico com um menor tempo de sobrevida

- Estadio clínico foi a variável que influenciou de forma significativa a sobrevida de cadelas com neoplasias luminais, enfatizando a importância do estadio completo de cadelas com neoplasias mamárias
- Superexpressão de COX-2 é um importante fator prognóstico com impacto na sobrevida
- Neoplasias com receptores hormonais positivos, baixo índice de proliferação celular (Ki67) e escore de 0-5 para COX-2 estão associadas a melhor prognóstico
- A avaliação da expressão imuno-histoquímica para RE, RP, Ki67 e COX-2 possibilita melhor avaliação do prognóstico em neoplasias mamárias caninas.
- Pacientes com neoplasias com COX-2 superexpresso se beneficiam de terapias com inibidores de COX2 em associação com terapia antiangiogênica

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como forma de elucidar os questionamentos que deram origem a este estudo, ressaltamos que o grupo de pesquisadores do Laboratório de Patologia Comparada da UFMG vem desenvolvendo ao longo dos últimos 20 anos diversos projetos priorizando a classificação histológica, a abordagem clínica e a padronização de marcadores prognósticos e preditivos em neoplasias mamárias de cadelas. Nesse sentido, realizamos um amplo levantamento epidemiológico, clínico-patológico com mais de 1500 casos de neoplasias mamárias em cadelas que resultaram na publicação de dois artigos: *Epidemiological, clinical and pathological evaluation of overall survival in canines with mammary neoplasms* (NUNES et al, 2018) e *Mixed tumors of the canine mammary glands: evaluation of prognostic factors, treatment, and overall survival* (NUNES et al., 2019). O primeiro estudo contribuiu para validação dos critérios estabelecidos pelo *Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors* (CASSALI et al., 2014). Os resultados com dados do tempo de sobrevida das pacientes e avaliação dos fatores prognósticos como tamanho do tumor, estadio clínico, grau e tipos histológicos reforçam a importancia de se adotar um sistema padronizado de classificação e abordagem de cadelas com neoplasias mamárias. O estudo confirmou ainda o potencial de agressividade dos tipos histológicos: carcinoma micropilar, carcinoma sólido, carcinoma tubular grau III e carcinossarcoma, conforme proposto por CASSALI et al. (2014). O segundo estudo avaliou dados epidemiológicos, clínico-patológicos, fatores prognósticos e abordagens terapêuticas em cadelas com tumores mistos (tumor misto benigno, carcinoma em tumor misto e carcinossarcoma). Nesse estudo, os autores concluíram que é importante estudar os tumores mistos e compreender a progressão tumoral. Carcinomas em tumores mistos são as neoplasias mais frequentes em cadelas e apresentam bom comportamento biológico, mas seu prognóstico pode variar dependendo da sua associação com outros subtipos histológicos epiteliais. Contudo, mesmo em estádios clínicos avançados, cadelas com carcinomas em tumores mistos sobrevivem mais do que cadelas com carcinossarcomas. Esses estudos avaliaram amplamente as neoplasias mamárias caninas observando uma diversidade de tipos histológicos com diferentes comportamentos biológicos e evolução clínica.

Como sabemos, o câncer de mama na mulher compreende um grupo heterogêneo influenciado por diversos fatores que vão desde a apresentação morfológica, clínica, molecular até a

resposta terapêutica. O avanço em tecnologias moleculares de expressão gênica e a definição do imunofenótipo por meio do estudo do perfil imuno-histoquímico contribuiu e revolucionou a classificação e a abordagem do câncer de mama na mulher. Desde o seu advento, grupos prognósticos são estabelecidos com implicações preditivas que permitem um tratamento individualizado para mulheres com câncer de mama.

Diversos estudos, incluindo os do nosso grupo, reforçam as semelhanças entre o câncer de mama na mulher e na cadela, apontando a cadela como um modelo espontâneo do câncer de mama para a espécie humana. De fato, neoplasias mamárias em cadelas também compreendem um grupo de doenças notavelmente diverso, reflexo de variações em seus padrões histológicos, molecular e comportamento biológico. A busca por um método confiável e assertivo de prognóstico, a luz do que vem sendo realizado na medicina, levou diversos investigadores a adotar a classificação molecular para tumores mamários caninos. Entretanto, em medicina veterinária, uma padronização e validação de marcadores imuno-histoquímico são necessárias. Os estudos apresentam metodologias diferentes que vão desde a seleção dos marcadores, execução da técnica a critérios de avaliação de positividade dos mesmos. Além disso, os estudos apresentam diferentes classificações imunofenótípicas e com resultados que não refletem um prognóstico confiável, não havendo concordância entre os autores o que dificulta a sua comparação.

Nesse sentido, buscamos empregar uma classificação padronizada e bem estabelecida na medicina humana para definir os imunofenótipos das neoplasias mamárias caninas. O consenso *St Gallen* com diretrizes preconizadas para a classificação de imunofenótipos na mulher ainda não havia sido empregado para a classificação das neoplasias mamárias em cadelas. Com a classificação dos subtipos imunofenóticos foi possível definir grupos com implicações no prognóstico. Os subtipos luminais foram mais frequentes na população de estudo, caracterizando de forma ampla o que os patologista e oncologistas se deparam na rotina do diagnóstico de câncer de mama em cadelas. Esse grupo de neoplasias representam os questionamentos diários quanto a abordagem terapêutica e definição do prognóstico. O subtipo luminal A foi associado com estágio clínico inicial, carcinoma em tumor misto, ausência de invasão linfática, menor grau histológico, maior tempo de sobrevida específica e maior tempo livre de doença. Luminal B HER2- foi o subtipo mais frequente no presente estudo e associado com tipos histológicos com alto potencial de agressividade como

carcinoma micropapilar e carcinoma sólido, alto grau histológico, invasão linfática, recidivas e metástases. Pior prognóstico também foi associado ao subtipo Luminal B HER2+, com menores taxas de sobrevida e maior risco de óbito.

O maior desafio para os oncologistas é estabelecer o prognóstico e decidir quais pacientes se beneficiarão de terapias complementares. Nesse sentido o perfil molecular pode auxiliar na definição de grupos prognósticos, mas ainda não tem valor preditivo para o câncer de mama em cadelas, uma vez que terapias alvo ainda não estão disponíveis, apresentam alto custo e não há doses estabelecidas. Em contrapartida, a definição do imunoprognóstico com o estudo de RE, RP, Ki67 e COX-2 além de fornecer valor prognóstico é também preditivo. Cadelas com neoplasias com expressão negativa para receptores hormonais, alta expressão de Ki67 e COX-2 apresentam pior prognóstico, porém se beneficiaram de terapias adjuvantes multimodais com o uso de quatro ciclos de carboplatina seguido de ciclofosfamida e firocoxibe de forma metronômica. A avaliação da expressão de COX-2 é um fator prognóstico extremamente importante no câncer de mama em cadelas, pois fornece uma alternativa terapêutica com resultados promissores, baixo custo e com poucos efeitos adversos.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADIE J, NGUYEN F, LOUSSOUARN D, PENA L, GAMA A, RIEDER N, et al. Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 2: immunophenotypes and prognostic significance. *Breast Cancer Res Treat.* 2017;(0123456789).

ALBERTS B, BRAY D, JOHNSON A et al. O Citoesqueleto. In: Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Fundamentos da Biologia Celular- Uma introdução à biologia molecular da célula.* Porto Alegre: Artmed 1999: 526-60

ARAI K, KANEKO S, NAOI M, SUZUKI K, MARUO K, UEHARA K. Expression of stratified squamous epitheliotype cytoqueratin by canine mammary epithelial cells during tumorigenesis: type I (acidic) 57 kilodalton cytoqueratin could be a molecular marker for malignant transformation of mammary epithelial cells. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 56, 51-58. *Arch*, 1994, 433:119-129.

ARAÚJO MR, CAMPOS LC, DAMASCENO KA, GAMBA CO, FERREIRA E, CASSALI GD. HER-2, EGFR, Cox-2 and Ki67 expression in lymph node metastasis of canine mammary carcinomas: Association with clinical-pathological parameters and overall survival. *Res Vet Sci* 2016;106:121–30

BEHA G, BRUNETTI B, ASPRONI P, MUSCATELLO L V., MILLANTA F, POLI A, et al. Molecular portrait-based correlation between primary canine mammary tumor and its lymph node metastasis: Possible prognostic-predictive models and/or stronghold for specific treatments? *BMC Vet Res.* 2012

BENJAMIN S A, LEE A C, SAUNDERS WJ. Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles. *Vet Pathol.* 1999;36(5):423–36.

BERTAGNOLLI AC, FERREIRA E, DIAS EJ, CASSALI GD. Canine mammary mixed tumours: Immunohistochemical expressions of EGFR and HER-2. *Aust Vet J.* 2011;89(8):312–7.

BLOWS FM, DRIVER KE, SCHMIDT MK, BROEKS A, VAN LEEUWEN FE, WESSELING J, et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: A collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med.* 2010;7(5)

BOSTOCK DE. *Veterinary professional development series canine and feline mammary neoplasms.* 1986;1986

BRODEY RS., GOLDSCHMIDT MH., ROSZEL JR. Canine mammary gland neoplasias. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 1983, 19, 61-90

CASSALI GD, DAMASCENO KA, BERTAGNOLLI AC, ESTRELA-LIMA A, LAVALLE GE, DI SANTIS GW, et al. Consensus regarding the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors: Benign mixed tumors, carcinomas in mixed tumors and carcinosarcomas. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology.* 2017.

CASSALI GD, LAVALLE GE, DE NARDI AB, FERREIRA E, BERTAGNOLLI AC, ESTRELA-LIMA A, et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. *Brazilian J Vet Pathol.* 2011;4(2):153–80.

CASSALI GD, LAVALLE GE, NARDI A. B DE, FERREIRA E, BERTAGNOLLI A.C, ESTRELA-LIMA A, et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. *Brazilian J Vet Pathol.* 2014;4(2):153–80.

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

CHANG S-C, CHANG C-C, CHANG T-J, WONG M-L. Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002). *J Am Vet Med Assoc.* 2005

CHEANG MCU, CHIA SK, VODUC D, GAO D, LEUNG S, SNIDER J, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009

DMAE-R, G. B, S.E. F, E. R, C. P, J.F.R. R, et al. High-throughput protein expression analysis using tissue microarray technology of a large well-characterised series identifies biologically distinct classes of breast cancer confirming recent cDNA expression analyses. *Int J Cancer.* 2005

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. *Res Vet Sci.* 1996

DORÉ M, LANTHIER I, SIROIS J. Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors. *Vet Pathol.* 2003

DOWNWARD J, YARDEN Y, MAYES E, SCRACE G, TOTTY N, STOCKWELL P, et al. Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature.* 1984

DUTRA AP, AZEVEDO JÚNIOR GM, SCHMITT FC, CASSALI GD. Assessment of cell proliferation and prognostic factors in canine mammary gland tumors. *Arq Bras Med Veterinária e Zootec* 2008;60(6):1403–12.

DUTRA AP, GRANJA NVM, SCHMITT FC, CASSALI GD. c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. *Brazilian J Med Biol Res.* 2004

ELSTON CW., ELLIS IO. Assessment of histological grade. ELSTON CW., ELLIS IO. Eds. *Systemic Pathology. The breast.* London: Churchill Livingstone, 1998, 365-84.

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. *Histopathol.*, 1991, 19, 403-10.

EROLE P, BOSCH A, ALEJANDRO PÉREZ-FIDALGO J, LLUCH A. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treatment Reviews.* 2012

FERREIRA E, BERTAGNOLLI AC, CAVALCANTI MF, SCHMITT FC, CASSALI GD. The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. *Vet Comp Oncol*. 2009;7(4):230–5.

FILHO JCO, KOMMERS GD, MASUDA EK, MARQUES MFPP, FIGHERA RA, IRIGOYEN LF, et al. Estudo retrospectivo de 1 . 647 tumores mamários em cães 1. 2010;30(2):177–85.

GAMA A, ALVES A, SCHMITT F. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: Application of the human classification. *Virchows Arch*. 2008;453(2):123–32.

GAMA A, GÄRTNER F, ALVES A, SCHMITT F. Immunohistochemical expression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) in canine mammary tissues. *Res Vet Sci*. 2009;87(3):432–7.

GOLDHIRSCH A, WINER EP, COATES AS, GELBER RD, PICCART-GEBHART M, THURLIMANN B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: Highlights of the st gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast Cancer 2013. *Ann Oncol*. 2013;24(9):2206–23.

GOLDHIRSCH A, WOOD WC, COATES AS, GELBER RD, THURLIMANN B, SENN HJ. Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: Highlights of the St Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011. *Ann Oncol*. 2011;22(8):1736–47.

GOLDSCHMIDT M, PEÑA L, RASOTTO R, ZAPPULLI V. Classification and Grading of Canine Mammary Tumors. *Vet Pathol [Internet]*. 2011;48(1):117–31.

GRÖSCH S, MAIER TJ, SCHIFFMANN S, GEISSLINGER G. Cyclooxygenase-2 (COX-2) - Independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. *Journal of the National Cancer Institute*. 2006.

growth factor and estradiol in canine mammary tumors. *Int J Cancer.*, v.40, n.2, p.230-232,1987.

GRÜNTZIG K, GRAF R, HÄSSIG M, WELLE M, MEIER D, LOTT G, et al. The Swiss canine cancer registry: A retrospective study on the occurrence of tumours in dogs in Switzerland from 1955 to 2008. *J Comp Pathol*. 2015;

GUIMARÃES MJ, CARVALHO MI, PIRES I, PRADA J, GIL AG, LOPES C, et al. Concurrent expression of cyclo-oxygenase-2 and epidermal growth factor receptor in canine malignant mammary tumours. *J Comp Pathol*. 2014

GUTIERREZ C & SCHIFF R. HER-2: biology, detection, and clinical implications. *Arch Pathol Lab Med*, 2011, 135 (1), 55-62.

HAMMOND MEH, HAYES DF, WOLFF AC, MANGU PB, TEMIN S. American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Oncol Pract* 2010;6(4):195–7

HAMPE JF, MISDORP W. Tumours and dysplasias of the mammary gland. *Bull World*

Health Organ. 1974

HENNESSY BT, GONZALEZ-ANGULO AM, STEMKE-HALE K, GILCREASE MZ, KRISHNAMURTHY S, LEE JS, et al. Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. *Cancer Res.* 2009

HERSCHKOWITZ JI, SIMIN K, WEIGMAN VJ, MIKAELIAN I, USARY J, HU Z, et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol.* 2007

HORTA RDS, LAVALLE GE., CUNHA RMC., MOURA LL., ARAÚJO RB., CASSALI GD. Influence of Surgical Technique on Overall Survival, Disease Free Interval and New Lesion Development Interval in Dogs with Mammary Tumors. *Adv Breast Cancer Res.* 2014;3(April):38–46.

HSU WL, HUANG HM, LIAO JW, WONG ML, CHANG SC. Increased survival in dogs with malignant mammary tumours overexpressing HER-2 protein and detection of a silent single nucleotide polymorphism in the canine HER-2 gene. *Vet J.* 2009;

IM KS, KIM NH, LIM HY, KIM HW, SHIN JI, SUR JH. Analysis of a New Histological and Molecular-Based Classification of Canine Mammary Neoplasia. *Vet Pathol.* 2014;51(3):549–59

JONES FE, STERN DF. Expression of dominant-negative ErbB2 in the mammary gland of transgenic mice reveals a role in lobuloalveolar development and lactation. *Oncogene.* 1999

KARAYANNOPOULOU M, KALDRYMIDOU E, CONSTANTINIDIS TC, DESSIRIS A. Adjuvant Post-operative Chemotherapy in Female dogs with Mammary Cancer. *J Vet Med Ser A Physiol Pathol Clin Med.* 2001;48(2):85–96.

KARAYANNOPOULOU M, KALDRYMIDOU E, CONSTANTINIDIS TC, DESSIRIS A. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: Application of a human grading method. *J Comp Pathol.* 2005;133(4):246–52.

KIM NH, LIM HY, IM KS, KIM JH, SUR JH. Identification of Triple-negative and Basal-like Canine Mammary Carcinomas using Four Basal Markers. *J Comp Pathol.* 2013;148(4):298–306.

KRISHNAMURTI U, SILVERMAN, J. HER2 in Breast Cancer: A Review and Update. *Adv Anat Pathol.* 2014; 21 (2):100-107.

LAVALLE GE, BERTAGNOLLI AC, TAVARES WLF, CASSALI GD. Cox-2 expression in canine mammary carcinomas: correlation with angiogenesis and overall survival. *Vet Pathol* 2009;46(6):1275–80.

LAVALLE GE, DE CAMPOS CB, BERTAGNOLLI AC, CASSALI GD. Canine malignant mammary gland neoplasms with advanced clinical staging treated with carboplatin and cyclooxygenase inhibitors. *In Vivo (Brooklyn).* 2012;26(3):375–9.

- MALZAHN K, MITZE M, THOENES M, MOLL R. Biological and prognostic significance of stratified epithelial cytokeratins in infiltrating ductal breast carcinomas. *Virchows Arch.* 1998
- MARTÍN DE LAS MULAS J, ORDÁS J, MILLÁN Y, FERNÁNDEZ-SORIA V, RAMÓN Y CAJAL S. Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas: An immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Breast Cancer Res Treat.* 2003
- MCDERMOTT U, DOWNING JR, STRATTON MR. Genomics and the Continuum of Cancer Care. *N Engl J Med.* 2011
- MERLO DF, ROSSI L, PELLEGRINO C, CEPPI M, CARDELLINO U, CAPURRO C, et al. Cancer Incidence in Pet Dogs: Findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. *2008;976–84*
- MILLANTA F, CITI S, DELLA SANTA D, PORCIANI M, POLI A. COX-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: Correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. *Breast Cancer Res Treat.* 2006
- MISDORP W. Tumors of the mammary gland. DJ M. Eds. *Tumors in domestic animals.* Ames: Blackwell, 2002, 575-606.
- MISDORP W., ELSE RW., HELLMÉN E., LIPSCOMB E. Definitions and explanatory notes. WHO histological classification of mammary tumors of the dog and cat. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1999, 18-27.
- MOE L. Population-based incidence of mammary tumours in some dog breeds. *J Reprod Fertil Suppl.* 2001;57:439–43.
- MOLL R, DIVO M, LANGBEIN L. The human keratins: Biology and pathology. *Histochemistry and Cell Biology.* 2008
- MURUA ESCOBAR H, BECKER K, BULLERDIEK J, NOLTE I. Animal Cytogenetics and Comparative Mapping The canine ERBB2 gene maps to a chromosome region frequently affected by aberrations in tumors of the dog (*Canis familiaris*). *Cytogenet Cell Genet.* 2001.
- NERURKAR VR, SESHADRI R, MULHERKAR R. et al. Receptors for epidermal growth factor and estradiol in canine mammary tumors. *Int J Cancer.* 1987; 40(2):230-232.
- NIELSEN TO, HSU FD, JENSEN K, CHEANG M, KARACA G, HU Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10(16):5367–74
- NUNES FC, CAMPOS CB, TEIXEIRA S V., BERTAGNOLLI AC, LAVALLE GE, CASSALI GD. Epidemiological, clinical and pathological evaluation of overall survival in canines with mammary neoplasms. *Arq Bras Med Vet e Zootec.* 2018

NUNES FC, DAMASCENO KA, DE CAMPOS CB, BERTAGNOLLI AC, LAVALLE GE, CASSALI GD. Mixed tumors of the canine mammary glands: Evaluation of prognostic factors, treatment, and overall survival. *Vet Anim Sci*. 2019

NUNES FC, GAMBA CO, DAMASCENO KA, CAMPOS CB, HORTA RS, ARAUJO MR, et al. Analisis of clinico-pathological data, therapeutical conduct and overall survival of canine mammary lesions attended at the veterinary hospital of the Federal University of Minas Gerais (UFMG). *Brazilian J Vet Pathol*. 2014;7(2):122

OLIVEIRA LO DE, OLIVEIRA RT DE, LORETTI AP, RODRIGUES R, DRIEMEIER D. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. 2003;31:105–10.

OWEN L. TNM Classification of tumours in domestic animals. *World Heal Organ*. 1980;1–52.

PEÑA LL, NIETO AI, PÉREZ-ALENZA D, CUESTA P, CASTAÑO M. Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: Relationship to clinical and pathologic variables. *J Vet Diagnostic Investig*. 1998

PEROU CM, JEFFREY SS, VAN DE RIJN M, REES CA, EISEN MB, ROSS DT, et al. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999

PEROU CM, SØRILE T, EISEN MB, VAN DE RIJN M, JEFFREY SS, RESS CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000

PHILIBERT JC, SNYDER PW, GLICKMAN N, GLICKMAN LT, KNAPP DW, WATERS DJ. Influence of Host Factors on Survival in Dogs with Malignant Mammary Gland Tumors. In: *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2003.

QUEIROGA F, LOPES C. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos factores de prognóstico Canine mammary tumours , research on new prognostic factors. *Rpcv*. 2002;97(543):119–27

QUEIROGA FL, PEREZ-ALENZA MD, SILVAN G, PEÑA L, LOPES C, ILLERA JC. Cox-2 levels in canine mammary tumors, including inflammatory mammary carcinoma: Clinicopathological features and prognostic significance. *Anticancer Res*. 2005

QUEIROGA FL, PIRES I, LOBO L, LOPES CS. The role of Cox-2 expression in the prognosis of dogs with malignant mammary tumours. *Res Vet Sci*. 2010

RAKHA EA, REIS-FILHO JS, ELLIS IO. Basal-like breast cancer: A critical review. *J Clin Oncol*. 2008;26(15):2568–81

REIS-FILHO JS, PUSZTAI L. Gene expression profiling in breast cancer: Classification, prognostication, and prediction. *Lancet*. 2011

RESSEL L, PULEIO R, LORIA GR, VANNOZZI I, MILLANTA F, CARACAPPA S, et al. HER-2 expression in canine morphologically normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissues and its correlation with the clinical outcome. *Res Vet Sci [Internet]*. 2013;94(2):299–305

RIBEIRO GM, BERTAGNOLLI C, ROCHA RM, CASSALI GD. Morphological Aspects and Immunophenotypic Profiles of Mammary Carcinomas in Benign-Mixed Tumors of Female Dogs. 2012;2012.

ROELOFS HMJ, TE MORSCHE RHM, VAN HEUMEN BWH, NAGENGAST FM, PETERS WHM. Over-expression of COX-2 mRNA in colorectal cancer. BMC Gastroenterol. 2014

ROELOFS HMJ, TE MORSCHE RHM, VAN HEUMEN BWH, NAGENGAST FM, PETERS WHM. Over-expression of COX-2 mRNA in colorectal cancer. BMC Gastroenterol. 2014;

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. 1999

RUTTEMAN GR, BLANKENSTEIN MA, MINKE J, MISDORP W. Steroid receptors in mammary tumours of the cat. Acta Endocrinol. 1991;

RUTTEMAN GR, FOEKENS JA, PORTENGEN H, VOS JH, BLANKENSTEIN MA, TESKE E, et al. Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in non-affected and tumorous mammary tissue of female dogs. Breast Cancer Res Treat. 1994

SANTOS A A, LOPES CC, RIBEIRO JR, MARTINS LR, SANTOS JC, AMORIM IF, et al. Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. BMC Vet Res 2013;9(1):1746–61.

SASSI F, BENAZZI C, CASTELLANI G, SARLI G. Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. BMC Vet Res. 2010;6

ŞENNAZLI G, YILDIRIM F, SÖNMEZ K, ARUN SS, GÜREL A. Immunopathologic evaluation of estrogen receptor, progesterone receptor, and Ki67 antibody expressions in canine mammary tumours. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2015

SILVA ILD, DIAS APM, BERTAGNOLLI AC, CASSALI GD, FERREIRA E. Analysis of EGFR and HER-2 expressions in ductal carcinomas in situ in canine mammary glands. Arq Bras Med Vet e Zootec. 2014

SLEECKX N, ROOSTER H DE, KROEZE EJBV, GINNEKEN C VAN, BRANTEGEM L VAN. Review Article Canine Mammary Tumours , an Overview Prevalence of CMTs Classification of CMTs. 2011;(Silver 1966).

SORENMO K. Canine mammary gland tumors. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2003;33(3):573–96.

SORENMO K. U, WORLEY DR, GOLDSCHMIDT MH. Tumors of the Mammary Gland. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN'S, E. G. Small clinical veterinary oncology. 5th. ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2013. p. 538-556.

SORENMO KU, KRISTIANSEN VM, COFONE MA, SHOFER FS, BREEN AM, LANGELAND M, et al. Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Vet Comp Oncol.* 2009;7(3):162–72.

SORENMO KU, RASOTTO R, ZAPPULLI V, GOLDSCHMIDT MH. Development, Anatomy, Histology, Lymphatic Drainage, Clinical Features, and Cell Differentiation Markers of Canine Mammary Gland Neoplasms. *Vet Pathol* 2011;48(1):85–97.

SØRLIE T, PEROU CM, TIBSHIRANI R, AAS T, GEISLER S, JOHNSEN H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci.* 2001

TORÍBIO JMDML, LIMA AE, MARTINS FILHO EF, RIBEIRO LGR, D’ASSIS MJMH, TEIXEIRA RG, et al. Clinical characterization, histopathologic diagnosis and geoprocessing of mammary tumours in female dogs from the city of Salvador, Bahia State. *Rev Ceres* 2012;59(4):427–33.

VASCELLARI M, CAPELLO K, CARMINATO A, ZANARDELLO C, BAIONI E, MUTINELLI F. Incidence of mammary tumors in the canine population living in the Veneto region (Northeastern Italy): Risk factors and similarities to human breast cancer. *Prev Vet Med.* 2016

WILLIAMS CS; MANN M, DUBOIS RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development *Oncogene*, 1999

WOLFF AC, HAMMOND ME. , HICKS DG. et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J. Clin. Oncol.*,v.31, n.31,p.3997-4013, 2013

WOLFF AC., HAMMOND MEH., 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 CATHARINE., TAUBE SE., TUBBS R., VANCE GH., VIJVER MV., 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. *J. Clin. Oncol.*, 2007, 25, 118-45.

XU R, PERLE MA, INGHIRAMI G, CHAN W, DELGADO Y, FEINER H. Amplification of Her-2/neu gene in Her-2/neu-overexpressing and -nonexpressing breast carcinomas and their synchronous benign, premalignant, and metastatic lesions detected by FISH in archival material. *Mod Pathol.* 2002

YAMAGAMI T, KOBAYASHI T, TAKAHASHI K, SUGIYAMA M. Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification. *J Vet Med Sci* 1996;58(11):1079–83.

ZUCCARI DAPC., SANTANA AE., CURY PM., CORDEIRO JA., ZANCHETTA NETTO D. Immunocytochemical study of Ki-67 as a prognostic marker in canine mammary neoplasia. *Vet. Clin. Pathol.*, 2004, 33, 23-28

ANEXOS

Anexo I - Carta de aprovação do CETEA/UFMG

 UFMG	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
Prezado(a):	
Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.	
Protocolo CEUA: 366/2016 Título do projeto: Identificação de fenótipos moleculares e sua relação com fatores clínico-patológicos, tratamento e sobrevida global em subtipos histológicos agressivos de neoplasias mamárias caninas Finalidade: Pesquisa Pesquisador responsável: Geovanni Dantas Cassali Unidade: Instituto de Ciências Biológicas Departamento: Departamento de Patologia	
Situação atual: Decisão Final	
Aprovado na reunião do dia 13/02/2017.	
Belo Horizonte, 14/02/2017.	
Atenciosamente,	
Sistema Solicite CEUA UFMG https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/	
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) 3400-4516 www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br	

Anexo II- Atividades desenvolvidas no período do doutorado (Maio de 2015 a Abril de 2019)

TRABALHOS RELACIONADOS À TESE

Artigos Publicados em periódicos:

NUNES, F.C.; CAMPOS, C.B.; TEIXEIRA, S.V.; BERTAGNOLLI, A.C.; LAVALLE, G.E.; CASSALI, G.D. Epidemiological, clinical and pathological evaluation of overall survival in canines with mammary neoplasms. Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia, v. 70, p. 1714-1722, 2018.

NUNES, FERNANDA CAMARGO; DAMASCENO, KARINE ARAÚJO; DE CAMPOS, CECÍLIA BONOLO; BERTAGNOLLI, ANGÉLICA CAVALHEIRO; LAVALLE, GLEIDICE EUNICE; CASSALI, GEOVANNI DANTAS. Mixed tumors of the canine mammary glands: evaluation of prognostic factors, treatment, and overall survival. Veterinary and Animal Science, v. 7, p. 1-6, 2018.

Resumos publicados em anais de eventos:

NUNES, FERNANDA C.; SILVEIRA, T. L. ; BALABRAM, D. ; BERTAGNOLLI, A. C. ; LAVALLE, G. E. ; CASSALI, G. D. . Imunofenótipos em neoplasias mamárias caninas: dados clínico-patológicos e sobrevida global. In: VI Encontro de Patologia da UFMG, 2018, Belo Horizonte. VI Encontro de Patologia da UFMG, 2018.

NUNES, FERNANDA C.; TEIXEIRA, S. V.; LAVALLE, G. E.; CASSALI, G. D. Levantamento de dados clínico-patológicos de cadelas portadoras de tumores mamários. In: V Encontro de Patologia da UFMG, 2016, Belo Horizonte. V Encontro de Patologia da UFMG, 2016.

NUNES, F. C.; DE CAMPOS, C. B.; TEIXEIRA, S. V.; LAVALLE, G. E.; CASSALI, G. D. Canine mammary gland carcinoma in mixed tumor: clinical staging, treatment and overall survival. In: Veterinary Cancer Society, 2014, Saint Louis. Veterinary Cancer Society, 2014.

NUNES, FERNANDA C.; CAMPOS, C. B.; TEIXEIRA, S. V.; OLIVEIRA, M. R.; MONTEIRO, L. N.; DAMASCENO, KARINE A.; NAKAGAKI, K. Y. R.; LAVALLE, G. E.

; CASSALI, G. D. Levantamento de Dados Clínico-patológico de cadelas com Tumor misto benigno, Carcinoma em tumor misto e Carcinossarcoma de glândulas mamárias atendidas no Hospital Veterinário da UFMG. In: III Encontro de Patologia Mamária: DIAGNÓSTICO, PROGNÓSTICO E TRATAMENTO DAS NEOPLASIAS MAMÁRIAS EM CADELAS E GATAS, 2016.

Resumos enviados para apresentação em eventos:

NUNES, FERNANDA C.; TEIXEIRA, S. V.; LAVALLE, G. E.; CASSALI, G. D. Levantamento de dados clínico-patológicos de cadelas portadoras de tumores mamários. In: V Encontro de Patologia da UFMG, 2016, Belo Horizonte. V Encontro de Patologia da UFMG, 2016.

NUNES, FERNANDA C.; SILVEIRA, T. L.; BALABRAM, D.; BERTAGNOLLI, A. C.; LAVALLE, G. E.; CASSALI, G. D. Imunofenótipos em neoplasias mamárias caninas: dados clínico-patológicos e sobrevida global. In: VI Encontro de Patologia da UFMG, 2018, Belo Horizonte. VI Encontro de Patologia da UFMG, 2018.

Nunes, F.C, Lavalle, G.E, Bertagnolli, A.C., Oliveira, M.R., Teixeira, S.V., Cassali, G.D. Imunofenótipos luminais em neoplasias mamárias caninas: características clinicopatológicas e sobrevida específica. Oncovet 2019

Fernanda Camargo Nunes, Gleidice Eunice Lavalle, Rúbia Cunha, Angélica Cavalheiro Bertagnolli, Geovanni Dantas Cassalli. Immunophenotypic profiles of canine mammary tumors. European Society of Veterinary Oncology, 2019.

Fernanda Camargo Nunes, Gleidice Eunice Lavalle, Miriã Rodrigues de Oliveira, Angélica Cavalheiro Bertagnolli, Karen Yumi Ribeiro Nakagaki, Geovanni Dantas Cassali. Estudo clínico-patológico de cadelas com tumores mamários atendidas hospital veterinário da universidade federal de minas gerais. Encontro de patologia mamária 2019

TRABALHOS NÃO RELACIONADOS À TESE

Artigos Publicados em periódicos:

DE SOUZA, THIAGO ALVES; DE CAMPOS, CECÍLIA BONOLO; DE BIASI BASSANI GONÇALVES, ALINE; **NUNES, FERNANDA CAMARGO**; MONTEIRO, LIDIANNE NARDUCCI; DE OLIVEIRA VASCONCELOS, ROSEMERI; CASSALI, GEOVANNI DANTAS. Relationship between the inflammatory tumor microenvironment and different histologic types of canine mammary tumors. RESEARCH IN VETERINARY SCIENCE, v. 119, p. 209-214, 2018.

TEIXEIRA, S. V.; **NUNES, F. C.**; LAVALLE, G. E.; CUNHA, R. M. C.; COSTA, P. M.; CARNEIRO, R. A. Differential Diagnosis between Esophageal Granuloma and Pulmonary Metastasis. ACTA SCIENTIAE VETERINARIAE, v. 46, p. 1-4, 2018.

CASSALI, G. D.; CAMPOS, CECÍLIA B.; BERTAGNOLLI, A. C.; ESTRELA-LIMA, A.; LAVALLE, G. E.; DAMASCENO, KARINE; NARDI, A. B.; COGLIATI, B.; COSTA, F. A.; SOBRAL, R.; SANTIS, G. W.; Fernandes, C.G.; FERREIRA, E.; SALGADO, B. S.; VIEIRA-FILHO, C. H. C.; SILVA, D. N.; MARTINS-FILHO, E. F.; TEIXEIRA, S.V.; **NUNES, FERNANDA CAMARGO**; NAKAGAKI, KAREN. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of feline mammary tumors. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 55, p. 1-17, 2018

CASSALI, GEOVANNI; DAMASCENO, KARINE; BERTAGNOLLI, ANGELICA; ESTRELA-LIMA, ALESSANDRA; LAVALLE, GLEIDICE; SANTIS, GIOVANA; NARDI, ANDRIGO; FERNANDES, CRISTINA; COGLIATI, BRUNO; SOBRAL, RENATA; COSTA, FERNANDA; FERREIRA, ENIO; SALGADO, BRENO; CAMPOS, CECILIA; D'ASSIS, MARIO; SILVA, LAIS; MACHADO, MARILIA; FIRMO, BRUNA; **NUNES, FERNANDA** ; NAKAGAKI, KAREN. Consensus regarding the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors: benign mixed tumors, carcinomas in mixed tumors and carcinosarcomas. BRAZILIAN JOURNAL OF VETERINARY PATHOLOGY, v. 10, p. 87-99, 2017.

DE CAMPOS, C. B.; LAVALLE, G. E.; FIALHO LIGÓRIO, S; **CAMARGO NUNES, F.**; CARNEIRO, R. A.; AMORIM, R. L.; CASSALI, G. D. Absence of significant adverse events following thalidomide administration in female dogs diagnosed with mammary gland carcinomas: VETERINARY RECORD, v. 179, p. 514-514, 2016.

TEIXEIRA, S. V., SILVA, I. L. D., **NUNES, F. C.**, CAMPOS, C. B., OLIVEIRA, M. R., LAVALLE, G. E., & CASSALI, G. D. (2019). Serum evaluation of leptin, IL-6, IGF-1 and estrogen in obese female dogs with early stages of mammary carcinoma. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 71(1), 143-150.

Capítulos de livros publicados

NUNES, F. C.; DE CAMPOS, C. B.; BERTAGNOLLI, A. C. Aspectos Epidemiológicos das Neoplasias Mamárias Caninas. PATOLOGIA MAMÁRIA CANINA DO DIAGNÓSTICO AO TRATAMENTO. 1ed. 2017, v. 1, p. 27

CAMPOS, CECÍLIA B.; LAVALLE, G. E.; **NUNES, F. C.** Terapias Complementares para Tratamento do Câncer de Mama. PATOLOGIA MAMÁRIA CANINA DO DIAGNÓSTICO AO TRATAMENTO. 1ed., 2017, v. 1, p. 185

NUNES, F. C.; BERTAGNOLLI, A. C. Neoplasias Mamárias em Machos. PATOLOGIA MAMÁRIA CANINA DO DIAGNÓSTICO AO TRATAMENTO. 1ed.: , 2017, v. 1, p. 193

Resumos enviados para apresentação em eventos:

NUNES, F. C.; DAMASCENO, KARINE A.; DE CAMPOS, C. B.; LAVALLE, G. E.; CASSALI, GEOVANNI D. Use of adjuvant chemotherapy in canine mammary gland carcinosarcomas. In: 3rd World Veterinary Cancer Congress, 2016, Foz do Iguaçu. 3rd World Veterinary Cancer Congress, 2016. v. 1'. p. 46.

NUNES, F. C.; DE CAMPOS, C. B.; TEIXEIRA, S. V.; OLIVEIRA, M. R.; LAVALLE, G. E. ; CASSALI, G. D . Avaliação de carcinomas mamários caninos com comportamento

agressivo e correlação com sobrevida global. In: 3 Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária - ENAPAVE 2015, 2015, Belo Horizonte. 3 Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária - ENAPAVE 2015, 2015. p. 448.

OLIVEIRA, M. R.; NUNES, F. C. ; DE CAMPOS, C. B. ; TEIXEIRA, S. V. ; LAVALLE, G. E. ; CASSALI, G. D. . Avaliação epidemiológica, clínico-patológica, tratamento e sobrevida global do carcinoma inflamatório canino. In: 3 Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária - ENAPAVE 2015, 2015, Belo Horizonte. 3 Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária - ENAPAVE 2015, 2015. p. 461.

TEIXEIRA, S. V.; NUNES, FERNANDA C.; OLIVEIRA, M. R.; LACERDA, B. C. E.; LAVALLE, G. E.; CASSALI, G. D. Incidência de sobrepeso e obesidade em cadelas atendidas pelo setor de Oncologia do Hospital Veterinário da UFMG: Aspectos comparativos com a população feminina de Belo Horizonte. In: V Encontro de Patologia da UFMG, 2016, Belo Horizonte. V Encontro de Patologia da UFMG, 2016.

TEIXEIRA, S. V.; NUNES, FERNANDA C. OLIVEIRA, M. R. CAMPOS, CECÍLIA B.; LAVALLE, G. E.; CASSALI, G. D. Levantamento de Dados Epidemiológicos, Clínico-Patológicos e Sobrevida Global de Gatas com Tumores Mamários Atendidas no Hospital Veterinário da UFMG. In: III Encontro de Patologia Mamária: DIAGNÓSTICO, PROGNÓSTICO E TRATAMENTO DAS NEOPLASIAS MAMÁRIAS EM CADELAS E GATAS, 2016, Salvador. III Encontro de Patologia Mamária: DIAGNÓSTICO, PROGNÓSTICO E TRATAMENTO DAS NEOPLASIAS MAMÁRIAS EM CADELAS E GATAS, 2016.