

MARINA RIOS DE ARAÚJO CAMPOS

**CARCINOMAS MAMÁRIOS CANINOS: ASPECTOS PATOLÓGICOS E
IMUNOFENOTÍPICOS DO TUMOR PRIMÁRIO E METÁSTASES
LINFONODAIS E SEU IMPACTO NA SOBREVIDA**

**Belo Horizonte
2015**

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

TESE DE DOUTORADO

**CARCINOMAS MAMÁRIOS CANINOS: ASPECTOS PATOLÓGICOS E
IMUNOFENOTÍPICOS DO TUMOR PRIMÁRIO E METÁSTASES
LINFONODAIS E SEU IMPACTO NA SOBREVIDA**

**Belo Horizonte
2015**

MARINA RIOS DE ARAÚJO CAMPOS

**CARCINOMAS MAMÁRIOS CANINOS: ASPECTOS PATOLÓGICOS E
IMUNOFENOTÍPICOS DO TUMOR PRIMÁRIO E METÁSTASES
LINFONODAIS E SEU IMPACTO NA SOBREVIDA**

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.

Área de concentração: Patologia Geral

Orientador: Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali

Co-Orientador: Prof. Dr. Enio Ferreira

Belo Horizonte
Faculdade de Medicina - UFMG
2015

C198c Campos, Marina Rios de Araújo.
Carcinomas mamários caninos [manuscrito]: aspectos patológicos e imunofenotípicos do tumor primário e metástases linfonodais e seu impacto na sobrevida. / Marina Rios de Araújo Campos. - - Belo Horizonte: 2015.
103f.: il.
Orientador: Geovanni Dantas Cassali.
Coorientador: Enio Ferreira.
Área de concentração: Patologia.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.
1. Neoplasias Mamárias Animais. 2. Metástase Neoplásica. 3. Linfonodos. 4. Imuno-Histoquímica. 5. Sobrevida. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Cassali, Geovanni Dantas. II. Ferreira, Enio. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.
NLM: QZ 200



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

UFMG

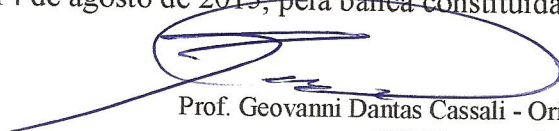
FOLHA DE APROVAÇÃO

Carcinomas mamários caninos: aspectos patológicos e imunofenotípicos do tumor primário e metástases linfonodais e seu impacto na sobrevida

MARINA RIOS DE ARAÚJO

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 14 de agosto de 2015, ~~pe~~ pela banca constituída pelos membros:



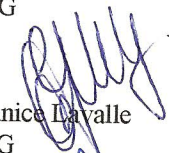
Prof. Geovanni Dantas Cassali - Orientador
UFMG




Prof. Epio Ferreira
UFMG



Profa. Marina De Brot Andrade
UFMG



Dra. Gleidice Eunice Lavalle
UFMG



Profa. Helenice Gobbi
UFTM



Dr. Agostinho Pinto Gouvêa
Prefeitura de BH

Belo Horizonte, 14 de agosto de 2015.



ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA MARINA RIOS DE ARAÚJO

Realizou-se, no dia 14 de agosto de 2015, às 08:30 horas, Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada *Carcinomas mamários caninos: aspectos patológicos e imunofenotípicos do tumor primário e metástases linfonodais e seu impacto na sobrevida*, apresentada por MARINA RIOS DE ARAÚJO, número de registro 2011716920, graduada no curso de MEDICINA VETERINARIA, 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). Enio Ferreira (UFMG), Prof(a). Marina De Brot Andrade (UFMG), Prof(a). Gleidice Eunice Lavallo (UFMG), Prof(a). Helenice Gobbi (UFTM), Prof(a). Agostinho Pinto Gouvêa (Prefeitura de BH).

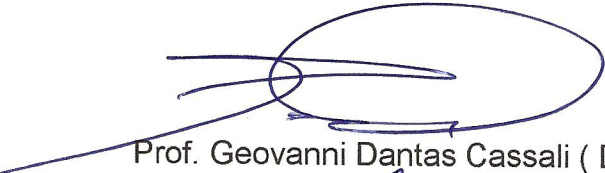
A Comissão considerou a tese:

Aprovada

Reprovada

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

Belo Horizonte, 14 de agosto de 2015.


Prof. Geovanni Dantas Cassali (Doutor)


Prof. Enio Ferreira (Doutor)


Prof(a). Marina De Brot Andrade (Doutora)


Dr(a). Gleidice Eunice Lavallo (Doutora)


Prof(a). Helenice Gobbi (Doutora)


Dr. Agostinho Pinto Gouvêa (Doutor)

*Ninguém é suficientemente perfeito,
que não possa aprender com o outro e, ninguém é totalmente destituído de
valores que não possa ensinar algo ao seu irmão.*

São Francisco de Assis

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho
a minha mãe Gorete, meu pai Helder
e ao meu grande amor Luciano*

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar presente em minha vida!

Ao meu grande amor e marido Luciano! Pelo companheirismo, amor e sempre um grande conselheiro!

À Minha Mãe, meu Porto Seguro! Sou eternamente grata pelo apoio incondicional às minhas escolhas!

Ao Meu Pai, pelo amor e compreensão!

Ao Professor Geovanni, orientador, pela oportunidade, confiança, paciência e pelos ensinamentos. Uma grande pessoa e um grande pesquisador!

Ao Professor Enio, co-orientador, pelo carinho, paciência e pelos ensinamentos. Um grande conselheiro e amigo, sempre disponível nas horas mais difíceis dessa jornada!

A todos os meus irmãos pelo carinho de sempre!

Às minhas cunhadas, cunhados, concunhadas, concunhados e aos meus sogros pela convivência harmoniosa e agradável e pelo incentivo nessa jornada.

Aos amigos do LPC, aqueles que já passaram e aos que lá ainda permanecem: Karine, Istéfanni, Conrado, Cecília, Lidiane, Diego, Fernanda Camargo, Stephane, Taty, Clarissa Ferracioli, Bruna, Yasmin, Fernanda IC, Bruna de Cássia, Ana Maciel, Gabriel, Emerson, Paula, Izabella e Carol pela convivência, parceria e companheirismo!

À Gi, pelo carinho e pelos conselhos, uma pessoa sempre disponível em ouvir!

A todos os professores, as secretárias e aos colegas do Departamento de Patologia Geral, pela convivência durante esse período e pela troca de experiências.

As técnicas do Departamento de Patologia Geral pelo auxílio no corte dos blocos de parafina e pela convivência.

Aos meus amigos, que sempre torcem pelo meu sucesso!

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

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho...

Muito obrigada!



Este trabalho foi realizado no Laboratório de Patologia Comparada do Departamento de Patologia Geral-ICB/UFMG, com apoio financeiro do CNPq, FAPEMIG e CAPES.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ANEXOS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Neoplasias mamárias caninas e importância das metástases na progressão tumoral	18
1.2 Drenagem linfática das glândulas mamárias caninas	19
1.3 Importância do estadiamento clínico em cadelas com neoplasias mamárias malignas	20
1.4 Fatores clínico-patológicos associados à disseminação do câncer de mama canino	21
1.4.1 Graduação histológica das neoplasias mamárias caninas	22
1.4.2 Classificação histológica (tipo histológico) das neoplasias mamárias caninas.....	23
1.4.3 Invasão de vasos linfáticos e sanguíneos	24
1.4.4 Extensão extracapsular	25
1.5 Marcadores moleculares em carcinomas mamários caninos	25
1.5.1 Expressão do Her-2 e do Egfr	26
1.5.2 Marcadores de proliferação celular (Ki67)	29
1.5.3 Cox-2.....	30
2. JUSTIFICATIVA	32
3. HIPÓTESE	33
4. OBJETIVOS.....	33
4.1 Objetivo geral	33
4.2 Objetivos específicos	33
5. MATERIAL E MÉTODOS	34
5.1 Espécimes mamários	34
5.2 Avaliação dos tumores primários e dos linfonodos regionais	34
5.3 Análise de sobrevivência global e acompanhamento dos animais	39
5.4 Análise Estatística	39
6. RESULTADOS	40
ARTIGO 1	41
ARTIGO 2.....	50
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
8. CONCLUSÕES GERAIS	84
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
10. ANEXOS.....	98

LISTA DE FIGURAS

Artigo 1 - Quantitation of the Regional Lymph Node Metastatic Burden and Prognosis in Malignant Mammary Tumors of Dogs

Figura 1	(A) Neoplastic proliferations characterized by numerous structures resembling acini contain significant fibrosis replacing part of the lymphoid parenchyma (macrometastases). 400x. Hematoxylin-eosin (H&E). (B) Neoplastic proliferation characterized by structures resembling acini localized in the subcapsular sinus (micrometastases). 200x. H&E. (C) Multiple deposits of isolated epithelial neoplastic cells (arrows) in the subcapsular sinus. The size of the largest metastatic deposit, measuring 0.06 mm, was used to classify lymph node metastasis as isolated tumor cells (ITC). 400x. H&E.....	44
Figura 2	(A) Kaplan–Meier survival curve for the animals according to the histologic types: MTC (carcinoma in mixed tumor; n = 32); PTC (papillary and tubular carcinoma; n = 11); SC (solid carcinoma; n = 16; median, 195 days); RTMT (rare type malignant mammary tumors; n = 18; median, 180 days); and CSS (carcinosarcoma; n = 7; median, 185 days). Animals with MTC and PTC not did reach median survival (P < .0001). (B) Kaplan–Meier survival curve for the animals with metastasis (n = 53, median, 275 days) and without metastasis (n = 31, not reaching median survival) (P < .0001).(C) Kaplan–Meier survival curve for the animals according to the number of lymph nodes involved: 0 (no metastatic lymph nodes; n = 31, not reaching median survival), 1 (1 metastatic lymph node; n = 37; median, 348 days), and ≥2 (≥2 metastatic lymph nodes; n = 16; median, 130 days) (P < .0001). (D) Kaplan–Meier survival curve for the animals according to the classification of metastasis: A (absence of metastasis; n = 31), B (macrometastases; n = 11; median, 240 days), C (micrometastases; n = 14), D (isolated tumor cells; n = 8; median, 262 days), and E (no measurable metastasis; n = 20; median, 180 days) (P < .01). The animals in groups A and C did not reach median survival.....	46
Figura 3	(A) Kaplan–Meier survival curve for the animals according to the area of metastasis: <20.11 mm ² (n = 28; not reaching median survival) and >20.11 mm ² (n = 5; median, 86.5 days) (P = .0457). (B) Kaplan–Meier survival curve for the animals according to the number of metastatic foci: <28 foci (n = 30; median, 404 days) and >28 foci (n = 3, not reaching median survival) (P = .629). (C) Kaplan–Meier survival curve for the animals according to the maximum diameter of metastasis: <7.32 mm (n = 27; not reaching median survival) and >7.32 mm (n = 6; median, 63 days) (P = .0068). (D) Kaplan–Meier survival curve for the animals according to the total metastatic area (TMA): <88.92 mm ² (n = 21; not reaching median survival) and >88.92 mm ² (n = 3; median, 110 days) (P = .3329).....	47

Artigo 2 - HER-2, EGFR, Cox-2 and Ki67 expression in lymph node metastasis of canine mammary carcinomas: association with clinical-pathological parameters and overall survival

Figura 1	Kaplan-Meier survival curve for the animals with primary mammary carcinoma with lymph node metastasis ($n=50$, median, 395 days) and without metastasis ($n=28$, not reaching median survival) ($P=0.002$).....	80
Figura 2	Kaplan-Meier survival curve for the animals with primary mammary carcinoma with lymph node metastasis according to size tumor: T1 (<3 cm, $n=11$, not reaching median survival), T2 (> 3 and < 5 cm, $n=14$; median, 275 days) and T3 (>5 cm, $n=22$, median, 308 days) ($P<0.02$).....	80
Figura 3	Kaplan-Meier survival curve for the animals with primary mammary carcinoma with lymph node metastasis according to angiolymphatic invasion: without angiolymphatic invasion ($n= 28$, median, 503 days) and with angiolymphatic invasion ($n= 21$, median, 188 days) ($P=0.01$).....	80
Figura 4	Kaplan-Meier survival curve for the animals with primary mammary carcinoma with lymph node metastasis according to extracapsular extension: without extracapsular extension ($n=30$, not reaching median survival) and with extracapsular extension ($n=20$, median, 180 days) ($P<0.0001$).....	80
Figura 5	Kaplan-Meier survival curve for the animals with primary mammary carcinoma without metastasis according to angiolymphatic invasion: without angiolymphatic invasion ($n= 23$; not reaching median survival) and with angiolymphatic invasion ($n= 5$, median, 341 days) ($P=0.008$).....	80
Figura 6	Kaplan-Meier survival curve for the animals with primary mammary carcinoma without metastasis according to histologic grade: grade I ($n= 11$, not reaching median survival), grade II ($n= 15$, not reaching median survival) and grade III ($n= 2$, median 263 days) ($P=0.005$).....	80
Figura 7	Kaplan-Meier survival curve for the animals with primary mammary carcinoma with lymph node metastasis according to the Ki67 index: Ki67 >24% index ($n=22$, median 322 days) and Ki67 <24% index ($n=22$, not reaching median survival) ($P=0.03$).....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Anticorpos usados no estudo imuno-histoquímico.....	39
Artigo 1 - Quantitation of the Regional Lymph Node Metastatic Burden and Prognosis in Malignant Mammary Tumors of Dogs		
Tabela 1	Distribution of histologic tumor types and lymph node features according to the adapted metastasis classification used in humans.....	45
Artigo 2 - HER-2, EGFR, Cox-2 and Ki67 expression in lymph node metastasis of canine mammary carcinomas: association with clinical-pathological parameters and overall survival		
Tabela 1	Details of immunohistochemical reagents and methods used in the study.....	75
Tabela 2	Clinical-pathological parameters of the primary mammary carcinomas with lymph node metastasis and without metastasis.....	76
Tabela 3	Immunohistochemical data of primary mammary carcinomas without metastasis, primary mammary carcinomas with lymph node metastasis and lymph node metastasis	78
Tabela 4	HER-2, EGFR, Cox-2 and Ki67 index status in primary mammary carcinomas and paired lymph node metastasis	79

LISTA DE ANEXOS

Anexo I	Carta de aprovação do CETEA/UFMG – Agosto 2011.....	98
Anexo II	Produção científica relacionada à tese no período de Agosto de 2011 a Julho de 2015.....	99
Anexo III	Produção científica não relacionada à tese no período de Agosto de 2011 a Julho de 2015.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS

AFIP: Instituto de Patologia das Forças Armadas

AMT: Área metastática total

ASCO/CAP: Sociedade Americana de Oncologia Clínica/Colégio Americano de Patologistas

CETEA: Comitê de Ética em Experimentação Animal

CGA: Campos de grande aumento

Cox: Ciclooxigenase

Cox-1: Ciclooxigenase 1

Cox-2: Ciclooxigenase 2

DAB: Diaminobenzidina

EEC: extensão extracapsular

EGFR: Receptor para fator de crescimento epidérmico

Egfr: Receptor para fator de crescimento epidérmico

H&E: Hematoxilina e Eosina

HER-1: Receptor para fator de crescimento epidérmico 1

HER-2: Receptor para fator de crescimento epidérmico 2

Her-2: Receptor para fator de crescimento epidérmico 2

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

IHQ: Imuno-histoquímica

PCR: Reação da cadeia da polimerase

RNA: ácido ribonucléico

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

VEGF: fator de crescimento vascular endotelial

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo determinar o papel prognóstico da imuno-expressão de Her-2, Egfr, Cox-2 e Ki67 e das características morfológicas (tamanho das metástases, número de linfonodos comprometidos e de focos metastáticos, presença de extensão extracapsular) em metástases linfonodais de carcinomas mamários caninos. Foram selecionados 54 carcinomas mamários primários com metástase linfonodal (T1,2,3N1M0) e 29 carcinomas mamários primários sem metástase (T1,2,3N0M0). As metástases linfonodais foram avaliadas de acordo com o tamanho [macrometástases (>2cm), micrometástases (entre 0,2cm e 2cm) e células tumorais isoladas (<0,2cm)], número de linfonodos positivos e de focos metastáticos e extensão extracapsular. Os tumores primários e as metástases linfonodais foram submetidos à imuno-histoquímica para Her-2, Egfr, Cox-2 e Ki67. Dados de sobrevida foram obtidos de 78 cadelas com um período de acompanhamento máximo de 1370 dias. A presença de metástases linfonodais, o acometimento de mais de um linfonodo, a ocorrência de extensão extracapsular, macrometástases, áreas de metástases >20,11 mm² e diâmetro metastático >7,32 mm apresentaram uma relação direta com uma menor sobrevida global. Na análise da expressão dos imunomarcadores foi observada uma concordância entre a expressão de Her-2, Cox-2 e Ki67 e discordância na expressão de Egfr em tumores primários e suas respectivas metástases. Entretanto, a maior expressão desses marcadores moleculares nas metástases não apresentou relação direta com um pior prognóstico para os animais. Concluiu-se que a mensuração das metástases linfonodais regionais dos carcinomas mamários caninos pode auxiliar na avaliação prognóstica dos animais. Contudo, apesar da relação direta da expressão de Her-2, Cox-2 e Ki67 nos tumores primários e suas respectivas metástases, a avaliação desses marcadores nas metástases não demonstrou ser determinante na definição prognóstica de cadelas com câncer de mama.

Palavras-chave: canino, metástase, linfonodo, carcinomas mamários, imuno-histoquímica, sobrevida

ABSTRACT

The present work aimed to determine the prognosis role of immunohistochemical expression of Her-2, Egfr, Cox-2 and Ki67 and the characteristics morphopathological (size of metastases, number of lymph nodes affected and of metastatic foci and presence of extracapsular extension) in lymph nodes metastasis of canine mammary carcinomas. We selected 54 primary mammary carcinomas with lymph node metastasis (T1,2,3N1M0) and 29 primary mammary carcinomas without metastasis (T1,2,3N0M0). Lymph nodes metastasis were evaluated according to size [macrometastasis (>2cm), micrometastasis (between 0.2cm and 2cm) and isolated tumor cells (<0.2cm)], number of positive lymph nodes and of metastatic focus, and extracapsular extension. Immunohistochemistry was performed in primary tumors and lymph nodes metastasis for evaluation of the expression of Her-2, Egfr, Cox-2 and Ki67. Survival data were obtained from 78 dogs and the maximum follow-up period was 1370 days. The presence of lymph node metastasis, the involvement of more than one positive lymph node, the presence of extracapsular extension, macrometastases, areas of metastasis >20.11 mm² and metastatic diameter >7.32 mm showed a direct relationship with shorter overall survival. In the immunohistochemistry analysis of markers we found a concordance between the expression of Her-2, Cox-2 and Ki67 and discordance between Egfr expression in metastatic primary tumors and paired lymph node metastasis. However, a high expression of these markers in lymph node metastasis did not exhibit direct relationship with a poor prognosis. We may conclude that the measurement of regional lymph node metastasis of canine mammary carcinomas should aid in the prognostic evaluation of the animals. However, despite the direct relationship of Her-2, Cox-2 and Ki67 expression in primary tumors and paired metastases, this assessment does not seem to be directly related to prognosis of the animal.

Key-words: canine, metastasis, lymph node, mammary carcinomas, immunohistochemistry, survival

1. INTRODUÇÃO

1.1 Neoplasias mamárias caninas e importância das metástases na progressão tumoral

Nos últimos anos, têm se verificado um aumento considerável da prevalência do câncer em cães, que é considerado por alguns autores como a maior causa de morte nessa espécie (Butler et al., 2013; Sorenmo et al., 2009). Em cadelas, as neoplasias mamárias representam 50 a 70% de todas as neoplasias (Sorenmo et al., 2013; Cassali et al., 2014), sendo que cerca de 60% são diagnosticadas como malignas e 23% apresentam metástases para linfonodos regionais (Nunes et al., 2014).

As neoplasias mamárias caninas geralmente se apresentam como nódulos circunscritos de tamanho, consistência e aderência para a pele e musculatura variáveis. Elas também podem estar associadas à ulceração da pele e reações inflamatórias locais. Vários tumores são frequentemente observados numa única glândula mamária ou pode envolver múltiplas glândulas mamárias simultaneamente e podem ser de diferentes tipos histológicos. No entanto, o tumor com o pior prognóstico sempre determina a evolução clínica do paciente. As glândulas mamárias abdominais caudais e inguinais são acometidas com mais frequência do que as glândulas torácicas (Cassali et al., 2014).

Todos os tumores mamários malignos tem o potencial para metastatizar. O risco e o padrão de metástase são influenciados pelo tipo histológico, diferenciação do tumor e vários outros fatores prognósticos. De forma geral, os tumores epiteliais malignos metastatizam através dos vasos linfáticos para os linfonodos regionais e pulmões enquanto que os tumores mesenquimais metastatizam via vasos sanguíneos diretamente para os pulmões (Sorenmo, 2003).

Vários fatores são responsáveis e estão envolvidos na disseminação tumoral e progressão das metástases. A formação de metástases é um processo complexo que depende de inúmeras interações entre células malignas e componentes dos tecidos normais do hospedeiro, especialmente o estroma. Assim, para o desenvolvimento de metástases, é necessário que as células neoplásicas percam sua capacidade de adesão, infiltrarem vasos linfáticos e/ou sanguíneos, sejam capazes de infiltrar o tecido a ser colonizado, induzam alterações do

estroma para sua implantação e levem posteriormente à angiogênese, permitindo então sua nutrição e desenvolvimento (Brasileiro-Filho et al, 2013).

1.2 Drenagem linfática das glândulas mamárias caninas

A drenagem linfática das glândulas mamárias, em cães, é complexa e os linfonodos anatomicamente ligados às glândulas mamárias são encontrados em duas regiões distintas (axilar e inguinal) (Sorenmo et al., 2013). As glândulas torácicas craniais e caudais são drenadas pelos linfonodos axilares ipsilaterais. A glândula abdominal cranial é drenada pelas duas regiões. As glândulas abdominais caudais e inguinais são drenadas pelos linfonodos inguinais ipsilaterais (Sorenmo et al., 2013; Cassali et al., 2014). O linfonodo inguinal é removido cirurgicamente quando há envolvimento neoplásico das glândulas abdominal caudal e inguinal. A remoção cirúrgica do linfonodo axilar é recomendada quando há alteração no tamanho e consistência ou quando se observam células neoplásicas na citologia (Cassali et al., 2014).

Em cadelas, a utilização de traçadores como o Azul Patente V, Azul de Metileno, Tecnésio 99m e a hemossiderina autóloga, para identificação dos linfonodos sentinela ainda é pouco usado na rotina prática, mas alguns estudos tem utilizado essa técnica (Pinheiro et al., 2003; Pinheiro et al., 2009; Beserra et al., 2013). O linfonodo sentinela é o primeiro linfonodo de uma cadeia linfática regional que recebe a linfa de um tumor primário e, por isso, espera-se que seja o primeiro a conter uma micrometástase (Cassali et al., 2014). Além disso, o uso desses marcadores também pode facilitar a localização e a exérese cirúrgica dos linfonodos axilares nas cadelas com neoplasias mamárias (Cassali et al., 2014)

Mudanças no padrão de drenagem linfática das glândulas mamárias com neoplasia foram descritas em um estudo prévio (Pereira et al., 2003). Esses autores descreveram que as glândulas mamárias torácicas com neoplasias podem ser drenadas pelos linfonodos das cadeias axilar, cervical superficial ou torácica ventral; as glândulas abdominais craniais e caudais com neoplasias pelos linfonodos das cadeias axilar, inguinal e poplíteo e as glândulas inguinais com neoplasias pelos linfonodos das cadeias inguinal e poplíteo (Pereira et al., 2003). Além disso, conexões linfáticas entre glândulas mamárias normais e glândulas

mamárias com neoplasias malignas podem ocorrer, apesar de serem raramente descritas (Patsikas et al., 2006).

1.3 Importância do estadiamento clínico em cadelas com neoplasias mamárias malignas

Os tumores mamários caninos são classificados de acordo com o sistema TNM que considera o tamanho tumoral (T1, 0–3 cm; T2, 3–5 cm; T3, >5 cm), o envolvimento dos linfonodos regionais (N0, ausência de metástase; N1, presença de metástase), e a presença de metástase distante, ou seja, metástase para órgãos distantes ou linfonodos não-regionais (M0, ausência de metástase; M1, presença de metástase). Esse sistema categoriza os animais em 5 estádios: I (T1N0M0); II (T2N0M0); III (T3N0M0); IV (T1,2,3N1M0); e V (T1,2,3N0,1M1) (Owen, 1980).

Através do exame histopatológico, avalia-se o comprometimento dos linfonodos regionais, considerando-os como linfonodos positivos ou negativos. Em mulheres, metástases regionais do câncer de mama são classificadas de acordo com o tamanho do foco metastático em macrometástases, quando os depósitos celulares são maiores que 2 mm; em micrometástases, quando os depósitos celulares medem entre 0,2 mm e 2 mm; e em células tumorais isoladas, quando os depósitos neoplásicos são menores que 0,2mm (Greene et al., 2002). Maiores taxas de recorrência e morte são observadas em mulheres com micrometástases quando comparadas com aquelas linfonodo negativas, e, essas avaliações somadas à avaliação da quantificação da carga metastática é um fator preditivo significativo de metástases em linfonodos não sentinela. (Fisher, 1978; Fisher e Gebhardt, 1978; Cote et al., 1999; Viale et al., 2005; Cserni et al., 2008; Chae et al., 2013). Entretanto, esse tipo de avaliação tem sido objeto de grande debate, quando não se observam diferenças no prognóstico de mulheres com presença de micrometástases ou células isoladas (Nagashima et al., 2006; Langer et al., 2005; Imoto et al., 2006; Cserni et al., 2003; Patani e Mokbel, 2009; Patani e Mokbel, 2011; Ahmed et al., 2014).

Assim como na mulher, o *status* dos linfonodos regionais tem um grande impacto na sobrevida de cães com neoplasias mamárias (Kurzman and Gilbertson, 1986; Hellmén et al., 1993; Yamagami et al., 1996; Perez Alenza et al., 1997; Nieto et al., 2000; Chang et al., 2005). Contudo, o atual sistema de estadiamento clínico (TNM) usado em medicina veterinária não leva em consideração as diferenças na localização dos linfonodos positivos

(por exemplo, ipsilateral ou contralateral), no tamanho dos focos metastáticos, a relevância da identificação de células tumorais isoladas ou ainda os métodos usados na detecção de micrometástases ocultas (De Matos et al., 2006). Além disso, há poucos estudos que avaliam a relevância prognóstica do tamanho das metástases regionais em cadelas com neoplasias mamárias (Szczubial e Lopuszynski, 2011). A identificação de macrometástases de carcinomas mamários em linfonodos regionais em cães parece ser essencial para determinação do prognóstico pós-cirúrgico (Szczubial e Lopuszynski, 2011). Apesar disso, esses autores não observaram diferenças na sobrevida global ou no tempo livre de doença entre animais sem metástase regional e aqueles com micrometástase.

Em medicina humana, sabe-se que aproximadamente 25% das pacientes linfonodo-negativas desenvolverão metástases distantes, e que poderiam ter sido beneficiadas pela quimioterapia adjuvante (Cote et al., 1999; Mies e Schlesselman, 2000; Fisher et al., 2010). A dificuldade na detecção de células neoplásicas isoladas ou de pequenos depósitos metastáticos em exame de rotina poderia gerar subestadiamento das pacientes, o que pode explicar em parte, a recorrência tumoral (Fisher et al., 2010). É provável que cadelas linfonodo-negativas também desenvolvam metástases distantes principalmente devido à dificuldade de detecção de depósitos metastáticos pequenos.

Esses pequenos depósitos metastáticos são definidos como metástases ocultas por não serem observados nos exames de rotina, mas através de revisão de lâminas ou emprego de outros métodos de estudo, como a imuno-histoquímica (IHQ), com o uso de anticorpos para marcadores epiteliais e a reação da cadeia da polimerase (PCR), com a avaliação de várias sequências de RNA (ácido ribonucleico) (Millis et al., 2002). De Matos et al (2006) detectaram micrometástases ocultas em linfonodos de cadelas com neoplasias mamárias, pela imuno-histoquímica, em 9,2% dos casos negativos na hematoxilina e eosina (H&E). Em medicina humana, a taxa de detecção de micrometástases ocultas varia entre 7% a 39%, dependendo do método empregado (Cote et al., 1999; Marinho et al., 2004).

1.4 Fatores clínico-patológicos associados à disseminação do câncer de mama canino

A avaliação do tumor primário e dos linfonodos regionais através de exame histopatológico de rotina aliado ao sistema de estadiamento clínico (TNM) são os principais métodos usados na

rotina clínica para determinação do prognóstico de cães com neoplasias mamárias (Sonrenmo et al., 2013; Cassali et al., 2014). Fatores morfológicos como o grau e o tipo histológico dos tumores e a invasão dos vasos linfáticos e sanguíneos por células tumorais parecem estar associados com maior potencial metastatizante e pior prognóstico em cadelas com neoplasias mamárias (Gilberston et al., 1983; MacKewen, 1990; Yamagami et al., 1996; Sorenmo, 2003; Karayannopoulou et al., 2005).

1.4.1 Graduação histológica das neoplasias mamárias caninas

A graduação histológica dos tumores da mama leva em conta a capacidade de diferenciação estrutural e nuclear das células. O sistema de graduação mais utilizado em mulheres com câncer de mama é o sistema de Nottingham (Elston e Ellis, 1991; 1998). Esse sistema considera formação tubular, o grau nuclear e o índice mitótico. Para a avaliação de cada fator são seguidos critérios específicos, para imprimir maior objetividade e reprodutibilidade. São atribuídos pontos a cada um dos itens, que posteriormente são somados, obtendo-se um escore final que permite classificar o tumor em bem diferenciado (grau I, ou baixo grau), moderadamente diferenciado (grau II, ou grau intermediário) e pouco diferenciado (grau III, ou alto grau). Em medicina veterinária, sistemas de graduação histológica dos tumores mamários com critérios bem definidos são pouco usados. Os sistemas mais usados são os descritos por Misdorp et al (1999) e Gilbertson et al (1983), ambos baseados em uma combinação de características celulares e nucleares.

Atualmente, há um aumento no número de pesquisas veterinárias que usam o critério de graduação histológica dos tumores mamários propostos por Nottingham (Cavalcanti et al., 1996; Dutra et al., 2004; Karayannopoulou et al., 2005; Dutra et al. 2008; Estrela Lima et al., 2010; Gamba et al., 2013; Tavasoly et al., 2013). Vários estudos mostram uma correlação entre o grau histológico e outros fatores prognósticos como tipo histológico, envolvimento linfático e sobrevida sendo que tumores com alto grau histológico estão associados a tipos histológicos mais agressivos, maior potencial metastatizante e pior sobrevida (MacKewen, 1990; Cavalcanti et al., 1996; Dutra et al., 2004; Karayannopoulou et al., 2005; Dutra et al., 2008; Estrela Lima et al., 2010; Tavasoly et al., 2013).

1.4.2 Classificação histológica (tipo histológico) das neoplasias mamárias caninas

A classificação histológica dos tumores mamários tem valor estabelecido pela sua importância em prever o comportamento biológico do tumor (Bostock, 1986; Sorenmo et al., 2013; Cassali et al., 2014). Os métodos de classificação das neoplasias mamárias caninas usadas nos diferentes estudos ainda não são uniformes, havendo desacordo sobre os tumores mais comuns, tais como tumores mistos e carcinomas em tumores mistos (Cassali et al., 2014). A proporção de tumores mamários malignos pode variar entre 26% a 73% (Perez Alenza et al., 2000; Nunes et al., 2014).

O sistema de classificação histológica veterinária mais usada é a proposta por Misdorp et al (1999) publicada pela AFIP (Instituto de Patologia das Forças Armadas). Goldschmidt et al (2011) sugeriram modificações nessa classificação com a inserção de alguns tipos histológicos de carcinomas simples como o carcinoma cribriforme e o carcinoma cístico papilar, além do carcinoma micropapilar. Recentemente, foi publicado o “Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors” em 2011 (Cassali et al., 2011) e com atualização dos conceitos publicados posteriormente (Cassali et al., 2014). Essas duas publicações objetivaram criar um guia para o diagnóstico das lesões mamárias e sugeriram modificações na classificação histológica veterinária de Misdorp et al (1999) com a inserção de lesões epiteliais não neoplásicas como as lesões de células colunares e também do carcinoma micropapilar e dos carcinomas lobulares na classificação histológica, além de outras alterações principalmente no que diz respeito a classificação dos tumores mistos, com a exclusão do termo “complexo”.

Os tumores mamários caninos são classificados a partir da avaliação de várias características tumorais como diferenciação celular, componente celular envolvido, arranjo celular e invasão da membrana basal. Dentre os tumores mais frequentes, são descritos os tumores mistos, caracterizados pela presença de componentes epiteliais (ductal e/ou acinar e células mioepiteliais) e componentes mesenquimais (Cassali et al., 2012). Os carcinomas em tumores mistos parecem ter comportamento biológico menos agressivos em relação aos carcinomas invasores simples (papilares, tubulares, sólidos e anaplásicos) (Yamagami et al., 1996; Cassali et al., 2012). Os carcinomas invasores simples geralmente têm padrão infiltrativo, invadem vasos linfáticos, disseminam-se para linfonodos regionais, linfonodos distantes ou pulmões enquanto que os tumores mistos geralmente crescem de forma expansiva, têm menor taxa de

invasão de vasos linfáticos e menos frequentemente metastatizam para linfonodos ou pulmões (Misdorp et al., 1972; Yamagami et al., 1996; Cassali et al., 2012). Contudo, quando consideramos a diferenciação tumoral apenas no grupo dos carcinomas invasores simples, verifica-se que os carcinomas papilares são os menos agressivos, seguido dos carcinomas tubulares, carcinomas sólidos e carcinomas anaplásicos (Misdorp et al., 1999; Sorenmo, 2003; Cassali et al., 2014).

O carcinoma micropapilar, um tipo especial de carcinoma, tem comportamento biológico extremamente agressivo com baixas taxas de sobrevida e alto potencial para metástases linfonodais (Cassali et al., 1999; Cassali et al., 2002; Gama et al., 2008; Gamba et al., 2013; Cassali et al., 2014).

Os carcinossarcomas descritos como neoplasias com ambos os componentes epitelial e mesenquimal malignos, possuem prognóstico desfavorável e podem desenvolver metástase após um ano (Sorenmo, 2003; Cassali et al., 2012). Além disso, outros sarcomas como fibrossarcoma e osteossarcoma estão associados a baixas taxas de sobrevida e alto potencial metastático, principalmente por via hematogênica (Helmeen et al., 1993).

1.4.3 Invasão de vasos linfáticos e sanguíneos

A infiltração de vasos sanguíneos e/ou linfáticos é um pré-requisito para o desenvolvimento de metástases (Brasileiro-Filho et al., 2013). A invasão neoplásica angiolinfática pode ser avaliada nas regiões peritumorais e intratumorais, utilizando-se coloração rotineira pela HE e/ou por imunohistoquímica utilizando marcadores celulares específicos. Invasão vascular tem sido associada com maior potencial metastático e pior sobrevida em mulheres com carcinomas mamários (Pinder et al., 1994; Gujam et al., 2014; Munzone et al., 2014). Os estudos que relacionam esse parâmetro patológico na avaliação das neoplasias mamárias caninas são escassos (Yamagami et al., 1996; Rasoto et al., 2012). Yamagami et al (1996) relataram relação direta entre a presença de invasão vascular ou linfática e pior sobrevida das cadelas com neoplasias mamárias. Rasoto et al (2012) observaram que em tumores infiltrativos a presença do padrão micropapilar, independente do tipo histológico estava diretamente associada com invasão linfática.

1.4.4 Extensão extracapsular

Extensão ou invasão extracapsular (EEC) pode ser definida como a extensão do tumor através da cápsula do linfonodo ao redor do tecido perinodal (Donegan et al., 1993; Fujii et al., 2010). EEC tem sido estudada em mulheres com câncer de mama, e sua relevância prognóstica é comprovada (Donegan et al., 1993; Leonardi et al., 1995; Pierce et al., 1995; Hetelekides et al., 2000; Neri et al., 2005; Fujii et al., 2010; Yajima et al., 2015). O benefício da realização de radioterapia nessas mulheres na diminuição das taxas de recorrência tumoral ou na melhora nas taxas de sobrevida ainda é objeto de grande debate (Donegan et al., 1993; Leonardi et al., 1995; Pierce et al., 1995; Hetelekides et al., 2000; Neri et al., 2005). Fujii et al (2010) observaram que a presença de extensão extracapsular em linfonodos sentinela de mulheres com câncer de mama, poderia prever doença axilar residual ou ainda metástase para linfonodos não-sentinela e, assim, ser um preditor crítico para progressão linfática locorregional.

Em cães com tumores mamários malignos essa alteração ainda não foi estudada e a relevância prognóstica da identificação de extensão extracapsular em linfonodos deveria ser investigada nessa espécie, podendo se tornar uma ferramenta complementar na avaliação prognóstica de cadelas com doença metastática.

1.5 Marcadores moleculares em carcinomas mamários caninos

Atualmente, com o avanço da biologia molecular, a detecção de marcadores tumorais por meio do estudo imuno-histoquímico tem sido utilizada para a determinação de fatores prognósticos em cães com neoplasias mamárias malignas, assim como é feito em mulheres com câncer de mama (Cassali et al., 2014). Tumores mamários podem desenvolver e progredir a partir da acumulação de alterações genéticas, exposição a fatores de crescimento ou hormônios sexuais (Klopfleisch et al., 2011; Sleenck et al., 2011).

Alguns estudos têm relacionado o aumento da expressão dos marcadores de proliferação celular e crescimento tumoral, como o Ki67, Her-2 e Egfr e o aumento da expressão de moléculas relacionadas ao ácido aracdônico como o Cox-2 com um pior prognóstico em cadelas com neoplasias mamárias (De las Mulas et al., 2003; Gama et al., 2009; Lavallo et al., 2009; Queiroga et al., 2010). Porém, alguns estudos relacionam a superexpressão de Her-2 em

tumores mamários malignos caninos com maior tempo de sobrevida global (Hsu et al., 2009; Ressel et al., 2013). A expressão de alguns desses marcadores como o Egfr, Cox-2 e Ki67 em neoplasias mamárias caninas tem sido associada com presença de metástases para linfonodos regionais, porém os estudos ainda são escassos (Penã et al., 1998; Guimarães et al., 2014; Queiroga et al., 2010).

Devido ao grande número de eventos celulares envolvidos no crescimento, diferenciação, proliferação, invasão e nas metástases, a investigação de múltiplas alterações moleculares tanto nos tumores primários como nas metástases tem assumido grande importância no entendimento da biologia das neoplasias mamárias (Argyle e Khanna et al., 2013). Nesse sentido, recentemente, alguns estudos humanos e caninos têm mostrado a avaliação de marcadores moleculares como E-caderina (Brunnetti et al., 2003), Her-2 (Gong et al., 2005; Cho et al., 2008; Wu et al., 2008; Beha et al., 2012; Jensen et al., 2012), Egfr (Cho et al., 2008; Wu et al., 2008), Cox-2 (Wu et al., 2008), ciclina D1 (Cho et al., 2008), receptor de progesterona (Wu et al., 2008; Beha et al., 2012), receptor de estrogênio (Wu et al., 2008; Beha et al., 2012; Jensen et al., 2012), citoqueratina 5/6 (Beha et al., 2012), citoqueratina 14 (Beha et al., 2012), citoqueratina 19 (Beha et al., 2012) e p63 (Beha et al., 2012) em tumores primários mamários e suas respectivas metástases.

1.5.1 Expressão do Her-2 e do Egfr

Proto-oncogenes são os genes responsáveis pela regulação da proliferação celular e alterações nesses genes podem levar ao desenvolvimento de neoplasias. A amplificação dos oncogenes *erbB*, especialmente os genes dos receptores de crescimento epidermal humano *cerbB-1* (*EGFR*, *HER-1*) e *erbB-2* (*HER-2*, *cerbB-2*, *HER-2/neu*), tem mostrado um papel fundamental na progressão do câncer de mama e outros tumores sólidos humanos (Slamon et al., 1987; Baccus et al., 1994; Klijn et al., 1994; Barghava et al., 2005; Normanno et al., 2006).

O proto-oncogene *HER-2* está localizado no cromossoma 17q21 e codifica uma glicoproteína transmembranar de 185 kilo-daltons (kDa) (Slamon et al., 1987; Bargmann et al., 1986). O gene *EGFR* localiza-se no cromossomo 7p11.2-p2 e codifica uma proteína de 170 kDa (Downward et al., 1984). Os dois genes codificam proteínas transmembranares com atividade

tirosina-quinase homóloga ao receptor do fator de crescimento epidermal (Slamon et al., 1987; Bargaman et al., 1986).

A amplificação do gene *HER-2* ou a superexpressão da proteína Her-2 tem sido identificada em aproximadamente 30% dos carcinomas mamários em mulheres e estão associados com pior prognóstico (Slamon et al., 1987). Além disso, os carcinomas mamários com superexpressão de Her-2 estão relacionados com características de malignidade como maior taxa de proliferação celular, perda da expressão de receptores de estrógeno e de progesterona, maior potencial metastático, resistência à terapia endócrina e resposta positiva à terapia com anticorpos monoclonais específicos anti-Her-2 (Slamon et al., 1987; Alred et al., 1992; Vogel et al., 2002; Xu et al., 2002; Gutierrez e Schiff, 2011).

Vários estudos têm avaliado a expressão de Her-2 em tumores primários e suas respectivas metástases em mulheres com câncer de mama. A maioria deles mostra uma maior porcentagem de concordância entre tumores primários e metástases e os casos discordantes variando entre 5 e 24% (Masood e Bui, 2000; Zidan et al., 2005; Hanna et al., 2007; Santinelli et al., 2008; Nassar et al., 2010; Malinowsky et al., 2012; Nikura et al., 2012). O fenômeno da heterogeneidade tumoral parece explicar a discordância entre expressão de Her-2 em tumores primários e suas respectivas metástases a partir da seleção de clones com status diferente do Her-2 e com capacidade de metastatizar (Malinowsky et al., 2012; Niikura et al., 2012).

Na espécie canina o gene *HER-2* está localizado no cromossomo 1q13.1 (Murua et al., 2001). A expressão elevada da proteína Her-2 também tem sido observada entre 17% a 36% dos carcinomas mamários desta espécie (Rungsipipat et al., 1999; De las Mulas et al., 2003; Dutra et al., 2004; Hsu et al., 2009; Ressel et al., 2013). Além disso, a superexpressão de Her-2 também é observada em lesões pré-malignas e carcinomas ductais *in situ* de humanos e cadelas sugerindo que a desregulação desta proteína também está envolvida com os processos iniciais da carcinogênese (Xu et al., 2002; Silva et al., 2014).

A relevância prognóstica da superexpressão do Her-2 em cadelas com carcinomas mamários ainda é controversa. De las Mulas et al (2003) mostraram associação da superexpressão desse marcador com pior prognóstico enquanto que outros estudos observaram maiores tempos na sobrevivência de animais com neoplasias mamárias com superexpressão do Her-2 (Ressel et al., 2013; Hsu et al., 2009). Além disso, Dutra et al (2004) não observaram correlação da

superexpressão de Her-2 com pior prognóstico. Contudo, esses estudos demonstraram associação entre a superexpressão de Her-2 e características de malignidade como alto índice mitótico e alto grau histológico, mas não com a presença de metástase linfonodal (De las Mulas et al., 2003; Dutra et al., 2004; Ressel et al., 2013).

A avaliação da expressão da proteína Her-2 em metástases linfonodais de cães com neoplasias mamárias foi realizada por Beha et al (2012). Nesse estudo, porém não houve avaliação da sobrevida dos animais e a expressão de Her-2 nos tumores primários e nas metástases foi avaliada como 0 (ausência de marcação), 1+ (<10% de células positivas), 2+ (entre 10 a 90% de células com marcação membranar completa) e 3+ (>90% de células com marcação membranar completa), sendo considerado positivo os casos 2+ e 3+. O percentual de concordância foi de 90% (18/20 casos) sendo observada discordância em 10% dos casos, com o tumor primário positivo para Her-2 e o linfonodo metastático negativo para esse marcador.

A proteína Egfr, outra molécula da família dos receptores do fator de crescimento epidermal humano, tem sido expressa em 20% a 30% dos carcinomas mamários, em mulheres. Alguns estudos têm associado sua superexpressão com pior prognóstico (Barghava et al., 2005; Klijn et al., 1994; Aziz et al., 2002; Tsutsui et al., 2002), porém outros não mostraram essa associação (Ferrero et al., 2001; Rampaul et al., 2004, Ciardelo and Tortora et al., 2003). Além disso, diferenças na expressão de Egfr em tumores primários e metástases linfonodais têm sido descrita em mulheres com câncer de mama (Malinowsky et al., 2012)

Elevada concentração ou expressão do Egfr tem sido detectada em tumores mamários caninos 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 la., 1987; Rutteman et al., 1994; Donnay et al., 1996; Gama et al., 2009; Bertagnolli et al., 2011; Carvalho et al., 2013; Kim et al., 2013; Guimarães et al., 2014). A associação entre a expressão elevada de EGFR e presença de metástase linfonodal foi observada em alguns estudos (Carvalho et al., 2013; Guimarães et al., 2014), mas não em outro (Gama et al., 2009). A relevância da expressão elevada de Egfr como fator prognóstico em cães com neoplasias mamárias ainda é controversa (Gama et al., 2009). A avaliação da expressão de Egfr em metástases linfonodais não foi ainda realizada em cães com neoplasias mamárias.

1.5.2 Marcadores de proliferação celular (Ki67)

Embora os mecanismos envolvidos na proliferação celular descontrolada dos tumores mamários não sejam bem entendidos, o aumento da proliferação celular é um evento característico dos tumores malignos (Klopfleisch et al., 2011). O índice de proliferação celular pode ser determinado por marcadores relacionados ao ciclo celular como o Ki67, com valor prognóstico significativo em mulheres e cadelas com carcinomas mamários (Bouzubar et al., 1989; Penã et al., 1998; Santos et al., 2013). Ki67 é uma proteína nuclear lábil, não expressa em células em repouso (G0), mas pode ser detectada em todas as outras fases do ciclo celular sendo comumente visualizada pelo anticorpo Mib-1 (Fitzgibbons, et al., 2000).

Tumores mamários com alto índice proliferativo têm maior chance de possuir clones com maior capacidade de disseminação e conseqüentemente de metástases. Características de agressividade tumoral como alto grau histológico, elevado tamanho tumoral e crescimento infiltrativo também podem estar presentes nesses tumores tanto em humanos como em cadelas (Vielh et al., 1990; Wintzer et al., 1991; Leonardi et al., 1992; Penã et al., 1998; Ferreira et al., 1999; De Matos et al., 2006) .

No câncer de mama de mulheres, tem sido sugerido um ponto de corte de 14% de células positivas para Ki67 que considera alto e baixo risco de desenvolvimento de metástases distantes (Goldhirsch et al., 2011; Van de vijver, 2014). Apesar disso, um consenso publicado em 2015 sobre câncer de mama inicial relatou que vários estudos apoiam o valor prognóstico do Ki67, porém a validação clínica tem-se revelado difícil e que, embora valores altos e baixos sejam reprodutíveis e clinicamente úteis, não há um ponto de corte ideal para o Ki67 (Coates et al., 2015).

Em cadelas com tumores mamários, os estudos mostram pontos de corte distintos para Ki67 ou ainda utilizam valores de média/desvio padrão de Ki67 para relacionar as variáveis clinico-patológicas. O consenso proposto pelo nosso grupo de pesquisa preconiza a utilização de pontos de corte de < 10% (baixo índice proliferativo), entre 10 a 25% (índice proliferativo intermediário) e > 25% (alto índice proliferativo) de células positivas para Ki67 (Cassali et al., 2014). Valores altos para Ki67 estão associados com alto risco de metástase.

Penã et al (1998) mostraram que altos valores de Ki67 estavam associados com presença de metástase linfonodal, pior sobrevida e menor tempo livre de doença, mas não com grau histológico. Nesse estudo, cadelas com tumores com > 24% de células positivas para Ki67 apresentavam alto risco de desenvolvimento de metástase distante. Dutra et al (2008) mostraram correlação positiva entre índice de Ki67 e grau histológico, pleomorfismo nuclear e contagem mitótica. Sarli et al (2002) utilizaram a média de Ki67 como ponto de corte e observaram que tumores com Ki67 > 6,97% estavam associados com pior prognóstico. Além disso, De Matos et al (2006) usando pontos de corte de < 27% (baixo índice proliferativo), entre 27% e 43% (índice proliferativo intermediário) e > 43% (alto índice proliferativo) de células positivas para Ki67 mostraram, na análise multivariada, correlação entre os índices de Ki67 com grau histológico, tamanho tumoral e crescimento infiltrativo, mas não com presença de metástase. Ferreira et al (2009) observaram que altos valores de Ki67 estavam associados com tumores maiores que 5cm. 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). Alguns estudos multivariados não observaram relevância prognóstica do Ki67, o que pode ser explicado pelo baixo número de tumores malignos estudados (Lohr et al., 1997; Lee et al., 2004).

A avaliação da expressão de Ki67 em metástases linfonodais de carcinomas mamários caninos foi encontrada apenas no estudo de Zachetti et al (2003). Esses autores compararam a expressão de Ki67 e PCNA com a marcação *in vivo* de bromodeoxyuridine (BrdU, um análogo da timidina que é captado por células na fase S do ciclo celular) por imunohistoquímica. Porém, neste estudo, avaliação da sobrevida dos animais não foi realizada e também não houve comparação da expressão de Ki67 nos tumores primários e nas metástases.

1.5.3 Cox-2

A ciclooxigenase é um composto homodímero com 2 subunidades de 70.000 Da e um grupo heme. São enzimas que catalizam a conversão de ácido aracdônico em uma série de diferentes prostaglandinas. Existem duas isoformas para as ciclooxigenases, a Cox-1 e Cox-2. A Cox-1 é expressa na forma constitutiva e está presente em uma grande variedade de tecidos exercendo papel importante na homeostase celular. A enzima Cox-2 é induzível e encontrada

primariamente no sítio inflamatório. É detectada constitutivamente em poucos tecidos, como rins (mácula densa), sistema nervoso central e placenta (Willians et al., 1999; Doré et al., 2003; Roelofs et al., 2014)

Além disso, Cox-2 tem papel importante em uma variedade de neoplasias em humanos e em animais e contribui para o desenvolvimento tumoral e angiogênese (Doré et al., 2003; Lavallo et al., 2009; Roelofs et al., 2014). Ela participa do metabolismo do ácido aracdônico, gerando prostaglandinas que são responsáveis pela proliferação celular, apoptose, modulação do sistema imune e angiogênese (Grösch et al., 2006). Condições celulares como hipóxia e expressão de citocinas (IL6), oncogenes (*RAS*, *HER-2 neu*) e fator de crescimento vascular endotelial (Vegf) estão associados ao aumento de expressão de Cox-2, levando a maior capacidade de invasão e angiogênese (Willians et al., 1999).

Embora o papel do Cox-2 e seus derivados metabólicos na carcinogênese sejam bem reconhecidos, a relevância prognóstica da expressão de Cox-2 em alguns tipos de câncer ainda não é totalmente estabelecida (Soslow et al., 2000; Surh et al., 2001). Alguns estudos não mostraram relevância prognóstica desse marcador em mastocitomas caninos e câncer de pulmão “non-small cell” (Vascellari et al., 2013; Mattsson et al., 2015).

Apesar disso, vários trabalhos relatam que a expressão imuno-histoquímica aumentada de Cox-2 está relacionada a pior prognóstico e fatores prognósticos desfavoráveis como tipo histológico mais agressivo, maior potencial metastático para linfonodos ou alto grau histológico em carcinomas mamários caninos e humanos. Denkert et al (2003) observaram que a alta expressão Cox-2 aumenta a habilidade de invasão das células tumorais e está diretamente associada a metástase para linfonodos no câncer de mama em humanos. Heller et al (2005) mostraram que expressão aumentada de Cox-2 estava associada a tipos histológicos agressivos, como os carcinomas anaplásicos de cadelas. 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. Lavallo et al (2009) observaram que a a alta expressão de Cox-2 em neoplasias mamárias caninas estava associada a pior prognóstico e menores tempos de sobrevida, porém não encontraram associação com tipo histológico. Queiroga et al (2010) observaram que maior expressão de Cox-2 em tumores mamários caninos estava associada com metástase linfonodal e à distância, e pior sobrevida. Além disso, 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. Recentemente, Millanta et al (2014) avaliaram a expressão de Cox-2 e de algumas moléculas relacionadas ao seu metabolismo (mPGE2-1 e EP4) em cadelas com carcinomas mamários e observaram que a expressão aumentada de Cox-2 e mPGE2-1 estavam associadas com alto grau histológico mas não com tipo histológico ou invasão linfática.

A análise da expressão de Cox-2 em lesões metastáticas de cães com neoplasias mamárias foi encontrada em apenas um estudo prévio (Pereira et al., 2009). Esses autores mostraram que em quase todos os casos a intensidade de expressão de Cox-2 nas lesões metastáticas (linfonodal e pulmonar) foi similar ou mais acentuada do que do tumor primário. Porém, nesse estudo não foi avaliada a sobrevida global dos animais de acordo com a expressão de Cox-2 nas lesões metastáticas.

2. JUSTIFICATIVA

A partir do exposto, observa-se que ainda são escassos os estudos relacionados às metástases para linfonodos regionais dos tumores mamários malignos em cadelas. Esses estudos são bem mais consistentes na medicina humana. Sabe-se que o *status* do linfonodo regional é um fator prognóstico importante em cadelas com neoplasias mamárias e é um dos parâmetros usados atualmente no estadiamento clínico desses animais. Por isso, um estudo morfológico criterioso torna-se essencial na tentativa de se estabelecer a importância e o potencial prognóstico da mensuração do tamanho das metástases, da identificação do número de linfonodos com metástase, da mensuração do número de focos metastáticos ou ainda da avaliação de extensão extracapsular que poderiam ser eventualmente incorporados futuramente no exame patológico rotineiro.

Além disso, outro passo importante no entendimento da progressão tumoral seria a avaliação da expressão de proteínas como o Her-2, Egfr, Cox-2 e Ki67 já descritas nos tumores primários, também nas metástases linfonodais sincrônicas. A frequência e a relevância prognóstica da expressão dessas proteínas já foram descritas nos tumores primários caninos, apesar de ainda haver controvérsias principalmente em relação ao Her-2 e Egfr, porém os estudos das lesões metastáticas ainda são extremamente escassos.

3. HIPÓTESE

A presença de macrometástases e de micrometástases bem como a positividade para Her-2 e Egfr, alto escore para Cox-2 e alto índice de proliferação celular em metástases linfonodais sincrônicas (no momento do diagnóstico inicial) estão associados a menor sobrevida em cadelas com carcinomas mamários.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar uma série de cadelas com carcinomas mamários e determinar e relacionar as características morfológicas, morfométricas e imunofenotípicas das metástases linfonodais sincrônicas com os aspectos clínico-patológicos e imunofenotípicos dos respectivos carcinomas mamários verificando-se as associações com a sobrevida global.

4.2 Objetivos específicos

I. Determinar e comparar a sobrevida global das cadelas com câncer de mama, com e sem metástase linfonodal sincrônica.

II. Determinar e comparar a sobrevida global de cadelas com câncer de mama, de acordo com a ocorrência de metástases linfonodais sincrônicas (macrometástase ou, micrometástase) ou a presença de células tumorais isoladas.

III. Determinar e comparar a sobrevida global de cadelas com câncer de mama, de acordo com o número de linfonodos regionais com metástases sincrônicas, o número de focos metastáticos, o diâmetro da metástases e as áreas de metástases nesses linfonodos.

IV. Identificar a presença e o número de linfonodos com extensão extracapsular verificando sua associação com a sobrevida global em cadelas com câncer de mama metastático.

V. Identificar carcinomas mamários caninos primários com e sem metástase linfonodal sincrônica de acordo com o tamanho tumoral, o tipo histológico, a graduação histológica e a invasão angiolinfática, determinando suas associações com a sobrevida global dos animais.

VI. Avaliar e relacionar a expressão imuno-histoquímica dos marcadores Her-2, Egfr, Cox-2 e Ki67 em carcinomas mamários primários com e sem metástase linfonodal e também em metástases linfonodais sincrônicas determinando a associação dessas expressões com a sobrevida global dos animais.

VII. Comparar os parâmetros clínico-patológicos (tamanho tumoral, tipo histológico, graduação histológica, invasão angiolinfática e extensão extracapsular) e moleculares (expressão imuno-histoquímica de Her-2, Egfr, Cox-2 e Ki67) dos carcinomas mamários primários com metástase linfonodal com os dos carcinomas mamários primários sem metástase.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Espécimes mamários

Foram revisados os casos de neoplasias mamárias malignas que apresentaram linfonodos regionais enviados em conjunto, durante o período de 2008 a 2013, obtidos dos arquivos do setor de Patologia do Departamento de Clínica e Cirurgias Veterinárias da Escola de Veterinária da UFMG e do Laboratório de Patologia Comparada - ICB/UFMG.

Todos os procedimentos experimentais foram executados 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 174/2011 (ANEXO I).

5.2 Avaliação dos tumores primários e dos linfonodos regionais

5.2.1 Estadiamento Clínico

Foi avaliado o tamanho do tumor (T1 de 0-3 cm; T2: 3-5cm; T3: >5cm), o envolvimento neoplásico de linfonodos regionais (N0: ausência de metástase; N1: presença de metástase) e

metástases distantes (órgãos distantes ou linfonodos não regionais - M0: ausência de metástase; M1: presença de metástase) (diagnóstico por imagem e/ou punção aspirativa de linfonodos não regionais). As cadelas que apresentavam metástase distante no momento do diagnóstico foram descartadas do estudo. Assim, os pacientes foram classificados em estadios I (T1, N0, M0), II (T2, N0, M0), III (T3, N0, M0) e IV (T1,2,3, N1, M0). Essas classificações foram realizadas segundo os critérios estabelecidos por Owen (1980).

5.2.2 Histopatologia

Foram obtidas secções histológicas de 4 µm do tumor primário, previamente fixados por 24 horas em formol neutro e tamponado a 10%, processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina e coradas pela técnica da H&E. Os tipos histológicos das neoplasias mamárias malignas foram classificados de acordo com o Consenso para diagnóstico, prognóstico e tratamento dos tumores mamários da cadela – 2013 (Cassali et al., 2014). Quando as cadelas apresentavam mais de um tumor drenado pelo mesmo linfonodo regional foi considerado para estudo o tumor mais agressivo.

Além disso, os tumores primários também foram avaliados quanto à presença de invasão angiolinfática considerada como a observação de êmbolos de células neoplásicas dentro de vasos linfáticos e/ou sanguíneos em áreas peritumorais e intratumorais.

Os linfonodos foram avaliados pelo método de H&E e também através de IHQ. Dessa forma, foram obtidas secções histológicas de 4 µm dos linfonodos, fixados por 24 horas em formol neutro e tamponado a 10%, processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina e corados pelas técnicas da H&E. O número de linfonodos dissecados, a presença de metástases e o número de focos metastáticos foram avaliados. Adicionalmente, as dimensões de comprimento e largura máximas (duas maiores dimensões) de todos os focos metastáticos foram mensuradas e a maior das duas dimensões foi usada como o diâmetro máximo do foco metastático.

Inicialmente foram consideradas metástases a presença de células epiteliais neoplásicas no parênquima linfóide ou distribuídas nos seios linfáticos (subcapsular e/ou medular) identificadas em lâminas coradas em H&E. Os linfonodos foram considerados livres de metástases somente após a confirmação pela coloração de imuno-histoquímica [citoqueratina

AE1/AE3, vimentina e p63]. A citoqueratina foi feita em todos os linfonodos para confirmar a ausência ou a presença de metástase. Já a vimentina e o p63 foram usados apenas nos linfonodos negativos para metástase (H&E) em casos diagnosticados como carcinossarcoma e adenioepitelioma maligno, respectivamente.

Quando mais de um linfonodo era positivo para metástase e foi acometido por vários focos metastáticos no mesmo paciente, foi considerada a medida do maior foco metastático (diâmetro máximo) em um linfonodo para a classificação em macrometástases, micrometástases e células tumorais isoladas (Ahmed et al., 2014). Linfonodos que apresentaram envolvimento metastático considerável, sem possibilidade de mensuração do tamanho dessas metástases (linfonodos parcialmente seccionados ou linfonodos com células metastáticas distribuídas difusamente em todo o linfonodo, porém sem limites definidos) foram classificados no grupo de metástase não mensurável.

Imagens de todos os focos metastáticos foram obtidas com o auxílio do microscópio Olympus BX41 utilizando sistema de captura “Spot Insight Color” em objetivas distintas dependendo do tamanho do foco metastático. As metástases foram medidas com o auxílio do *software Corel Draw 11*.

Além disso, todos os animais com metástases foram estratificados de acordo com o número de linfonodos envolvidos, o diâmetro máximo das metástases e a área de metástase (largura máxima \times altura máxima). Além disso, quando mais de um foco metastático foi identificado em um ou mais linfonodos do mesmo animal, áreas metastáticas individuais foram somadas para o cálculo da área metastática total (AMT). O número de linfonodos positivos para metástases foram agrupados em duas categorias (1 ou ≥ 2 linfonodos positivos). Para todas as outras análises, um ponto de corte (média mais um desvio padrão) foi estabelecido para estratificação em grupos. O diâmetro máximo e o número de focos metastáticos de cada animal foram usados para obter as médias de cada grupo. Todos os focos metastáticos foram mensurados para obter uma área metastática média em animais com mais de um foco metastático. A AMT de cada animal foi usada para obter a média do grupo.

Os linfonodos com metástase também foram avaliados quanto à presença de extensão extracapsular. Extensão extracapsular foi definida como a extensão do tumor através da cápsula linfonodal em pelo menos um linfonodo ao redor do tecido perinodal.

5.2.3 Graduação Histológica

Os tumores foram graduados 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 e Ellis, 1998). Para a obtenção do grau histológico combinado 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 – baixo grau; 6 – 7 pontos: grau II – grau intermediário; 8 – 9 pontos: grau III – alto grau.

5.2.4 Imuno-histoquímica

Após a revisão dos casos, secções histológicas de 4 µm dos tumores primários e das metástases linfonodais foram obtidas para realização da imuno-histoquímica. No procedimento imuno-histoquímico foi usado o método polimérico (ADVANCE HRP – ready to use – DakoCytomation). Para realização de bloqueio da peroxidase endógena as lâminas foram incubadas em solução de H2O2 3% em álcool metílico por 15 minutos. Os reagentes foram aplicados pela técnica manual, sendo o tempo de incubação do anticorpo secundário e do polímero de 30 minutos, e do cromógeno DAB (DAB substrate system, Dakocytomation), de 5 minutos. Os anticorpos primários utilizados estão descritos na tabela 1, com suas respectivas fontes, diluições, método de recuperação antigênica, solução de recuperação antigênica e tempo de incubação do anticorpo primário. Como controles positivos foram usados secções de carcinomas mamários positivos para Her-2, Egfr, Cox-2, p63 e citoqueratina AE1/AE3. Secção de um carcinossarcoma positivo para vimentina também foi usado como controle positivo. Os controles negativos foram obtidos por substituição do anticorpo primário pelo soro normal.

A expressão de Her-2 foi determinada pelo sistema de escore semiquantitativo estabelecido pela Sociedade Americana de Oncologia Clínica, Colégio Americano de Patologistas (ASCO/CAP) (Wolff et al., 2013) (0 = ausência de marcação ou marcação membranar incompleta e muito fraca em $\leq 10\%$ das células tumorais; 1+ = marcação membranar incompleta e muito fraca em $\geq 10\%$ das células tumorais; 2+ = marcação incompleta e/ou fraca/moderada em $> 10\%$ das células tumorais ou marcação completa e intensa em $\leq 10\%$ das células tumorais; 3+ = marcação completa e intensa em $> 10\%$ das células tumorais), com casos 0, 1+ e 2+ considerados negativos e casos 3+ positivos.

Para avaliação do Egfr foi usado um critério adaptado da ASCO/CAP de análise do Her-2 (Wolff et al., 2013) sendo os espécimes com escores 0, 1+ e 2+ considerados como negativos e com 3+ como positivos.

Positividade para Cox-2 foi considerada pela marcação citoplasmática, e os casos foram classificados pelo sistema semiquantitativo que considera distribuição [porcentagem de células positivas em cinco campos de 400x: 0= ausência, 1= $< 10\%$ de células positivas, 2= entre 10% e 30%, 3= entre 31% e 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 (Lavallo et al., 2009).

O índice de proliferação celular foi calculado pela contagem manual do número de núcleos positivos para Ki67 em um total de 1000 células neoplásicas em áreas de *hot spot* (Dutra et al., 2008). A avaliação da imunomarcação para citoqueratina AE1/AE3, vimentina ou p63 nos linfonodos foi qualitativa (positivo ou negativo).

Tabela 1. Anticorpos usados no estudo imuno-histoquímico.

Antígeno	Clone	Fabricante	Diluição	Recuperação antigênica	Solução retrieval (ph)	Tempo de incubação (h)
Her-2	policlonal	Dako	1:200	Banho maria (98 °C)	citrato (6,0)	16
Egfr	31G7	Zymed	1:50	Enzimática	pepsina	16
Cox-2	SP21	Labvision	1:80	Banho maria (98 °C)	citrato (6,0)	16
Ki67	Mib	Dako	1:25	calor pressurizado (Pascal) (125°C)	citrato (6,0)	1
Citoqueratina	AE1/AE3	Dako	1:100	Banho maria (98 °C)	citrato (6,0)	1
Vimentina	V9	Dako	1:100	Banho maria (98 °C)	citrato (6,0)	1
p63	4A4	Neomarkers	1:80	Banho maria (98 °C)	citrato (6,0)	16

5.3 Análise de sobrevida global e acompanhamento dos animais

O tempo de sobrevida foi definido (em dias) como sendo o período entre a data da exérese cirúrgica do tumor até a data de óbito do animal que morreu pela doença (*end points*). Os animais que foram a óbito por razões desconhecidas ou causas não relacionadas ao tumor, ou que deixaram de ser acompanhados foram considerados censurados. Em relação aos animais portadores de metástase em linfonodo regional (T1,2,3N1M0), foi identificado que 38% dos animais foram submetidos ao tratamento quimioterápico (4 ciclos de quimioterapia, com intervalos de 21 dias) como adjuvante a cirurgia de acordo com as recomendações preconizadas no “*Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors*” (Cassali et al., 2014)

5.4 Análise Estatística

Os resultados quantitativos obtidos que apresentaram distribuição normal foram submetidos à análise de variância a 5% de probabilidade, seguido de teste de médias (Mann-Whitney ou teste t não pareado). Para relacionar as variáveis clínico-patológicas foram utilizados os Teste Qui-quadrado ou método Exato de Fisher. Possíveis correlações foram avaliadas pelo Teste de Spearman. Para avaliar a concordância da expressão dos marcadores moleculares nos tumores primários e suas respectivas metástases foi usado o coeficiente de Kappa (Landis e Kock, 1977). As curvas de sobrevida foram derivadas da estimativa de Kaplan-Meier (teste de log rank).

Foram consideradas significativas as associações e correlações cuja probabilidade de significância do teste foi $p < 0,05$. As análises foram realizadas com auxílio do “software” de estatística *Graph Pad Prism v. 6.0* e do *GraphPad Prism QuickCalcs*.

6. RESULTADOS

Os resultados serão apresentados sob a forma de dois artigos científicos elaborados (publicado e submetido para publicação) durante o período de doutoramento.

ARTIGO 1

Quantitation of the Regional Lymph Node Metastatic Burden and Prognosis in Malignant Mammary Tumors of Dogs

Publicado no periódico Journal of Veterinary Internal Medicine, Julho de 2015

Quantitation of the Regional Lymph Node Metastatic Burden and Prognosis in Malignant Mammary Tumors of Dogs

M.R. de Araújo, L.C. Campos, E. Ferreira, and G.D. Cassali

Background: As in women, regional lymph node status impacts survival in dogs with malignant mammary tumors. However, few studies have evaluated regional lymph node metastases in dogs with malignant mammary gland tumors.

Objectives: To estimate overall survival based on the assessments of the lymph node status and the morphologic and morphometric features in female dogs with malignant mammary gland tumors.

Materials and Methods: In total, 178 lymph nodes from 97 female dogs were assessed and reviewed, and after confirmation by immunohistochemistry (IHC), 161 lymph nodes were selected for analysis of metastases. Animals were considered metastasis-free (negative lymph nodes) only after IHC analysis for cytokeratin AE1/AE3. The number of positive lymph nodes, the number of metastatic foci, the maximum diameter and the area of metastasis were analyzed, and estimates of overall survival were made.

Results: Dogs with metastasis had lower mean survival than those with metastasis-free regional lymph nodes, showing a direct relationship between the number of affected lymph nodes and shorter survival. However, histologic analysis of the lymph nodes identified lower survival rates in animals with macrometastases and isolated tumor cells, areas of metastasis >20.11 mm², and metastatic diameters >7.32 mm.

Conclusion: The identification of ≥ 1 lymph nodes positive for metastasis and morphometric characterization of lymphatic metastases indicate the prognostic relevance of lymph nodes status in dogs with mammary tumors.

Key words: Canine; Lymph node; Mammary tumors; Metastasis; Survival.

In human medicine, axillary lymph node status is an important prognostic factor for women with breast cancer.¹ Sentinel lymph node (SLN) biopsy is the current standard of care for staging the clinically negative axilla in breast cancer patients, with axillary lymph node dissection reserved for patients with clinical axillary metastases or metastases found on SLN biopsy.^{2,3} An SLN is the first node draining the primary tumor in the regional lymphatic basin. The SLNs are identified by the uptake of a tracer (e.g., radioactive tracer, vital dye, or a combination of both) or by the identification of a labeled afferent lymphatic vessel.⁴ The presence of lymph node metastasis in the absence of recurrence is the single most important prognostic factor in breast cancer, and postoperative adjuvant therapy should be selected according to the number of metastatic lymph nodes, tumor size, histologic grade, and lymphatic vascular invasion, in addition to the patient's age, human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) status, and hormone receptor status.^{5,6}

From the Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, Brazil (de Araújo, Campos, Ferreira, Cassali).

This research was conducted at the Department of General Pathology, Institute of Biological Sciences, Laboratory of Comparative Pathology, Federal University of Minas Gerais.

Corresponding author: Dr G.D. Cassali, Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brazil; e-mail: cassalig@icb.ufmg.br

Submitted July 16, 2014; Revised February 19, 2015; Accepted June 10, 2015.

Copyright © 2015 by the American College of Veterinary Internal Medicine

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

DOI: 10.1111/jvim.13576

Abbreviations:

H&E	hematoxylin-eosin
HER-2	human epidermal growth factor receptor 2
ICB	Institute of Biological Sciences
IHC	immunohistochemistry
ITC	isolated tumor cells
SD	standard deviation
SLN	sentinel lymph node
TMA	total metastatic area
UFMG	Federal University of Minas Gerais

Regional metastases of breast cancer in women are classified as macrometastases when they feature clusters of neoplastic cells >2 mm, whereas those with clusters of neoplastic cells between 0.2 and 2 mm are classified as micrometastases, and those with clusters <0.2 mm are classified as isolated tumor cells (ITC).⁷ Higher rates of recurrence and death are observed in women with micrometastases compared with women with negative lymph nodes; these assessments, coupled with quantification of metastatic burden, are a clinically relevant predictor of non-SLN metastasis.^{8–13} This type of assessment, however, has been the subject of great debate, because there are no differences in prognosis between women with micrometastases and those with ITC.^{14–21}

As in women, regional lymph node status has major impact on the survival of dogs with mammary tumors.^{22–27} In dogs, the use of tracers for identifying SLNs is rarely used in routine practice, but recent studies have evaluated these techniques.^{28,29}

Mammary tumors represent 52% of all cancers in female dogs, and 50% are malignant.^{30,31} Currently, surgery is the first-line treatment for mammary tumors in dogs, except for inflammatory carcinoma.³² The extent of surgery depends on patient stage, lymphatic

drainage, and size and location of the lesions.³³ The lymphatic drainage of neoplastic mammary glands is complex, and the lymph nodes anatomically linked to the mammary glands are found in 2 distinct regions (i.e., axillary and inguinal). The thoracic cranial and caudal glands drain toward the ipsilateral axillary lymph nodes. The abdominal cranial mammary gland often drains to both regions. The caudal and inguinal abdominal glands drain into the ipsilateral superficial inguinal lymph node.²⁸ Furthermore, lymphatic connections between neoplastic and normal adjacent mammary glands are rare but can occur.²⁸ Thus, additional studies related to SLNs in dogs should be developed for further clarification of the lymphatic drainage of neoplastic mammary glands.

In general, the inguinal lymph nodes must be resected en bloc, along the inguinal mammary gland, whenever this gland is removed or, as with axillary lymph nodes, when changes in their shape, volume, or consistency are observed.³⁴

In dogs, the modified TNM classification states that all N1 cases (dogs with histologic or cytologic evidence of metastases) are classified as either stage IV (any T, N1, M0) or stage V (any T, any N, M1).³⁴ This classification, however, does not take into account differences in the location of positive nodes (i.e., ipsilateral or contralateral), the size of the metastatic focus, the clinical relevance of isolated or small clusters of neoplastic cells or the methods used to detect occult micrometastases.³⁵

The identification of locoregional lymph node macrometastases from malignant epithelial mammary tumors is essential for determining postsurgical prognosis.³⁶ However, no differences in disease-free survival and overall survival times between animals without metastasis and animals with lymph node micrometastases were reported in that study.³⁶

Thus, this study aimed to analyze estimated overall survival based on assessing the classification of lymph node metastasis, the number of metastatic lymph nodes, and the sizes and numbers of metastatic foci present in the inguinal and axillary lymph nodes of female dogs with malignant mammary gland tumors.

Materials and Methods

All procedures were performed under the guidelines and with the approval of the Ethics Committee in Animal Experimentation at the Federal University of Minas Gerais (UFMG), protocol 174/2011.

Samples

One hundred and seventy-eight regional lymph nodes (162 inguinal, 14 axillary, and 2 location not available) were assessed from 97 female dogs with malignant mammary tumors. The intact or spayed animals were subjected only to the surgical treatment of their mammary tumors, without adjuvant treatment, at the Hospital of the Veterinary School of the Federal University of Minas Gerais (UFMG) between 2008 and 2013. Before surgery, all animals had complete clinical examinations that included hematology and serum biochemistry. Feed, but not water, was withheld for 36 hours before surgery. Moreover, the dogs underwent thoracic

radiography to rule out distant metastasis at the time of diagnosis and abdominal ultrasound examination only when serum biochemical changes or increased abdominal size were observed. The surgical technique (e.g., simple tumor removal, simple mastectomy, regional mastectomy, and radical mastectomy) was chosen according to the number of lesions and sites, considering the lymphatic drainage and established prognostic factors such as lesion size and existence of skin or muscular adhesions, as previously described.³⁴ The present study included 3 (3.1%) simple mastectomies, 46 (47.4%) regional mastectomies, and 43 (44.4%) radical mastectomies; the type of surgery was unknown for 5 dogs. All of the tumors were completely excised, and the muscle fascia was not removed in any cases. The inguinal lymph nodes were resected en bloc, along with the inguinal mammary gland, whenever this gland was removed, or in the same manner as the axillary lymph nodes when they were enlarged, adherent, or firm.

The surgical specimens (mammary tumors and lymph nodes) were obtained from archives of the Pathology Department of the Veterinary Clinic and Surgery at the Veterinary School of UFMG and of the Laboratory of Comparative Pathology at the Institute of Biological Sciences (ICB/UFMG) and were analyzed by 3 veterinary pathologists (MRA, EF, and GDC).

Histopathology and Immunohistochemistry

The lymph nodes were sectioned by a single longitudinal slice along the long axis. Larger lymph nodes were sectioned longitudinally and then transversally, with multiple sections obtained. All of the sections were included in different cassettes and were analyzed together, evaluating the long axis of the lymph node. The primary tumors also were sectioned for histopathologic analyses. The tumor samples and regional lymph nodes were fixed in 10% buffered formalin and routinely prepared and stained with hematoxylin-eosin (H&E). Three veterinary pathologists (MRA, EF, and GDC) histologically examined a minimum of 3 sections (3 μ m) of the mammary tumors. When tumors were >5 cm, a minimum of 5 sections were examined. All tumors were classified according to the veterinary histological classification.^{33,37,38} One section (3 μ m) of each lymph node was cut and stained with H&E. Three veterinary pathologists (MRA, EF and GDC) reviewed all of the lymph nodes. In addition, the maximum width and length (the 2 greatest dimensions) of all metastatic foci in each positive lymph node were measured, and the larger of the 2 measurements was used as the maximum diameter of the metastatic focus.

To confirm the absence of metastasis, a consecutive section (3 μ m) of the same paraffin block obtained for H&E analysis of each lymph node negative for metastasis was cut for IHC analysis. The slides were deparaffinized, rehydrated in graded alcohol, and subjected to heat-induced antigen retrieval with antigen retrieval solution^a (water bath at 98°C; pH 6.0). The sections were stained with antibodies specific for cytokeratin (CK) AE1/AE3^a (1:100, clone AE1/AE3), vimentin^a (1:100, clone V9), or P63^b (1:80, clone 4A4) and were incubated for 1 hour at ambient temperature. The cytokeratin stain was performed for all H&E lymph node slides that were scored as negative for metastasis. The vimentin and p63 stains were performed only for H&E lymph nodes slides negative for metastasis and with primary diagnoses of carcinosarcoma and malignant adenomyoepithelioma, respectively. The IHC was used only to confirm the absence of metastasis and cases positive for metastasis by IHC were excluded from pathologic analyses. After incubation, the antigen was immunodetected using the Dako Advance (HRP) Visualization Method^a with diaminobenzidine (DAB Substrate System)^a as the chromogen. Sections were counterstained with Mayer's hematoxylin, dehydrated, and mounted in a synthetic medium. Normal mammary glands were used as

positive controls. Negative controls were assessed using Ultra V block normal serum^c as the primary antibody.

Neoplastic cells in the lymphoid parenchyma or distributed in the lymphatic sinuses (i.e., subcapsular, medullary, or both) in H&E-stained sections were considered metastases as previously described.²¹ When >1 lymph node in the same patient was affected by several metastatic foci, the largest metastatic focus was measured (maximum diameter) for the classification of metastasis as macrometastases, micrometastases, or ITC. Lymph nodes were considered free of metastases only after confirmation by IHC staining.

Images of all metastatic foci were obtained on an Olympus BX41 microscope using a Spot Insight Color Capture System with different objectives depending on the size of the metastatic focus. Metastases were measured using the software Corel Draw 11.

The animals were organized into 5 groups according to a classification of metastasis adapted from human medicine: A (animals without metastasis); B (animals with macrometastases: lymph node metastases >2 mm; Fig 1A); C (animals with micrometastases: foci of neoplastic cells with diameters ranging from 0.2 to 2 mm; Fig 1B); D (animals with ITC: foci of neoplastic cells <0.2 mm; Fig 1C); and E (animals with nonmeasurable metastasis). Group E included animals with lymph nodes that had considerable metastatic involvement but in which it was not possible to measure metastasis (i.e., lymph nodes partially sectioned or lymph nodes with metastatic burden distributed diffusely without defined limits).

In addition, all animals with metastasis were stratified according to the number of lymph nodes involved, the number of metastatic foci, the maximum diameter of metastasis, and the area of metastasis (maximum width × maximum length). Moreover, when >1 metastatic focus was identified in ≥1 lymph nodes in the same patient, individual metastatic areas were summed to calculate the total metastatic area (TMA).⁸ For all of these analyses, a cut-off (mean plus 1 standard deviation [SD]) was established for stratification into groups. The number of lymph nodes involved, the maximum diameter of the lymph node metastases and the number of metastatic foci from each animal were used to obtain the averages for each group. All of the metastatic foci were measured to obtain an average metastatic area in animals that had >1 metastatic focus. The TMA from each animal was used to obtain the mean for the group.

Survival Time

The animals with malignant mammary tumors were assessed, and the endpoints were defined according to the type of analyses: histologic tumor types (827 days of follow-up; 84 animals),

presence or absence of lymph node metastasis (1112 days of follow-up; 84 animals), number of lymph nodes involved (778 days of follow-up; 84 animals), classification of metastasis (778 days of follow-up; 84 animals), area of metastasis (285 days of follow-up; 33 animals), number of metastatic foci (537 days of follow-up; 33 animals), maximum diameter of metastasis (285 days of follow-up; 33 animals), and TMA (778 days of follow-up; 24 animals).

Survival time was defined as the period (days) between surgical tumor removal and date of death from disease. The cause of death was confirmed at the postmortem examination. Animals that were alive and that died of unknown causes or causes unrelated to the tumor were censored. Among the most common causes was visceral (Calazar) leishmaniasis (*Leishmania chagasi*), which is endemic in the city of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, where the research was conducted. Other causes of death were external causes (road accidents), orthopedic surgery, and cardiorespiratory and neurological conditions.

Statistical Analysis

Survival curves were calculated using the Kaplan–Meier estimator, and statistical significance was examined using a log-rank test, after a normality test, with $P < .05$ considered significant. Survival data were evaluated according to the histologic tumor types, presence or absence of lymph node metastasis, number of lymph nodes involved, classification of lymph node metastasis, area of metastasis, number of metastatic foci, maximum diameter of metastasis, and TMA.

Results

The ages of the 97 animals at the time of surgery ranged from 4 to 16 years (mean, 10.7 ± 2.7 years). The dogs were predominantly purebred (68/93; 72.34%), and poodles ($n = 31$) were the most common breed. Mongrel dogs were observed less frequently (25/93; 26.60%), and the breed was not recorded for 4 dogs. The dogs were intact (52/76; 68.42%) and spayed (24/76; 31.58%); reproductive status was not available for 21 dogs. The inguinal and caudal abdominal glands were the predominant sites of the lesions (31/93; 33.33% each) in relation to the multi-centric localization (15/93; 16.13%), cranial abdominal glands (12/93; 12.90%), and thoracic glands (4/93; 4.31%). In 4 cases, the site of the lesions was not confirmed. None of the

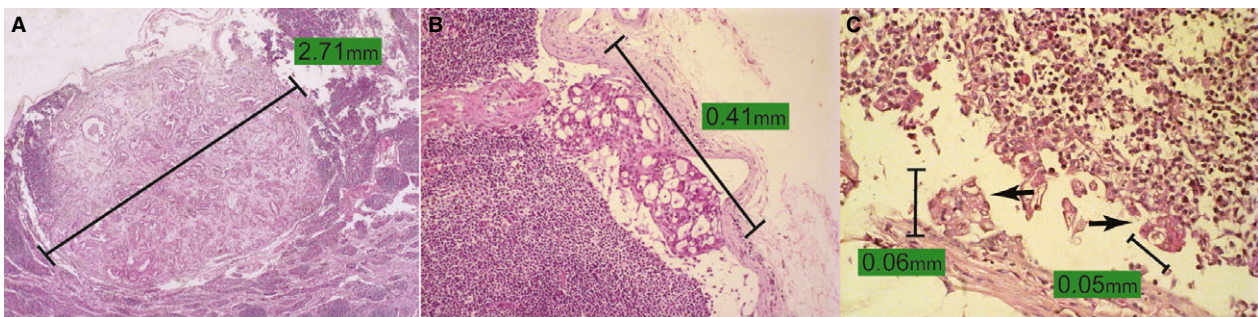


Fig 1. (A) Neoplastic proliferations characterized by numerous structures resembling acini contain significant fibrosis replacing part of the lymphoid parenchyma (macrometastases). 400x. Hematoxylin-eosin (H&E). (B) Neoplastic proliferation characterized by structures resembling acini localized in the subcapsular sinus (micrometastases). 200x. H&E. (C) Multiple deposits of isolated epithelial neoplastic cells (arrows) in the subcapsular sinus. The size of the largest metastatic deposit, measuring 0.06 mm, was used to classify lymph node metastasis as isolated tumor cells (ITC). 400x. H&E.

animals had pulmonary changes on radiographic examination, changes in abdominal ultrasound findings, or both at the time of surgery.

Initially, 178 lymph nodes (162 inguinal, 14 axillary and 2 location not confirmed) of 97 dogs were accessed. However, after IHC analysis, 161 lymph nodes of 90 dogs were considered for study. Among 161 lymph nodes, 49.7% (80) were diagnosed as metastatic. One axillary lymph node and multiple ipsilateral axillary lymph nodes were removed from 5.7% (5/88) and 3.4% (3/88) of dogs, respectively. One ipsilateral inguinal lymph node and multiple ipsilateral inguinal lymph nodes were identified in 39.8% (35/88) and 47.7% (42/88) of dogs, respectively. Both axillary and inguinal lymph nodes were excised from 3.4% (3/88) of dogs. In 2 dogs, the lymph node site was not recorded. Dogs with lymph node metastasis were predominantly observed (57/90; 63.3%) relative to dogs without lymph node metastasis (33/90; 36.7%, Table 1). The mean number of evaluated nodes per animal was 1.78 (SD, 1.01), with a maximum of 6 and a minimum of 1 lymph node. The mean number of metastatic lymph nodes per animal was 1.4 (SD, 0.75), with a maximum of 5 and a minimum of 1 metastatic lymph node. The inguinal lymphatic region was the predominant site of metastasis (45/55; 81.8%) relative to the axillary lymphatic region (8/55; 14.5%) and simultaneous occurrence (inguinal and axillary; 2/55; 3.6%). The site of metastasis was not confirmed in 2 dogs.

Carcinomas in mixed tumors were the most common cancer, and the rarest tumors were lipid-rich carcinoma, malignant adenomyoepithelioma, pleomorphic lobular carcinoma, malignant phyllodes tumor, and invasive micropapillary carcinoma, all of which were included in

the group of rare types of malignant mammary tumors (Table 1). The animals with carcinoma in mixed tumors, rare types of malignant tumors, solid carcinoma, papillary and tubular carcinoma and carcinosarcoma had mean respective survival times of 485.5 ± 259.4 days (not reaching median survival), 227.1 ± 235.2 days (median, 180 days), 228.2 ± 253.4 days (median, 195 days), 401.7 ± 196.8 days (not reaching median survival), and 163.3 ± 115.7 days (median, 185 days). Animals with solid carcinoma, carcinosarcoma, and rare types of malignant mammary tumors had lower survival rates than animals with carcinoma in mixed tumors and papillary and tubular carcinoma ($P < .0001$; Fig 2A).

Regarding the presence or absence of lymph node metastasis, the animals with metastasis had lower survival times (mean, 253.9 ± 244.2 days and median, 275 days) compared with animals without metastasis (mean 530.6 ± 286.8 days and not reaching median survival; $P < .0001$; Fig 2B).

When the number of lymph nodes involved was evaluated, the presence of ≥ 2 metastatic ipsilateral lymph nodes (equal or different lymphatic basins) was associated with lower survival ($P < .0001$; Fig 2C). The mean survival times of animals with lymph nodes without metastasis, with 1 metastatic lymph node, and with ≥ 2 metastatic lymph nodes were 497.6 ± 238.4 days (not reaching median survival), 275.3 ± 223.2 days (median, 348 days), and 174.2 ± 192.8 days (median, 130 days), respectively.

Animals with isolated tumor cells (group D; mean, 200.1 ± 108.0 days and not reaching median survival), nonmeasurable metastases (group E; mean, 191.8 ± 186.9 days and median, 180 days), and

Table 1. Distribution of histologic tumor types and lymph node features according to the adapted metastasis classification used in humans.

	Absence of Metastasis Group A (n [%]) (n = 33)	Macrometastases Group B (n [%]) (n = 13)	Micrometastases Group C (n [%]) (n = 15)	Isolated Tumor Cells Group D (n [%]) (n = 9)	No Measurable Metastasis Group E (n [%]) (n = 20)
Histologic types (n = 90)					
MTC	24 [72.7]	4 [30.8]	3 [20.0]	3 [33.3]	1 [5.0]
SC	3 [9.1]	1 [7.7]	2 [13.3]	1 [11.1]	9 [45.0]
RTMT*	2 [6.1]	6 [46.2]	2 [13.3]	0 [0]	8 [40.0]
PTC**	2 [6.1]	0 [0]	7 [46.7]	3 [33.3]	1 [5.0]
CSS	2 [6.1]	2 [15.4]	1 [6.7]	2 [22.2]	1 [5.0]
Lymph node metastasis area (n = 33)					
<20.11 mm ²	0 [0]	6 [54.5]	14 [100]	8 [100]	0 [0]
>20.11 mm ²	0 [0]	5 [45.5]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Lymph node metastatic foci (n = 33)					
<28 foci	0 [0]	11 [100]	13 [92.9]	6 [75]	0 [0]
>28 foci	0 [0]	0 [0]	1 [7.1]	2 [25]	0 [0]
Lymph node maximum diameter (n = 33)					
<7.32 mm	0 [0]	5 [45.5]	14 [100]	8 [100]	0 [0]
>7.32 mm	0 [0]	6 [54.5]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Lymph node total metastatic area (n = 24)					
<88.92 mm ²	0 [0]	3 [50]	13 [100]	5 [100]	0 [0]
>88.92 mm ²	0 [0]	3 [50]	0 [0]	0 [0]	0 [0]

MTC, carcinoma in mixed tumor; SC, solid carcinoma; RTMT*, rare type malignant mammary tumors (including micropapillary carcinoma, n = 14; lipid-rich carcinoma, n = 1; pleomorphic lobular carcinoma, n = 1; malignant adenomyoepithelioma, n = 1; and malignant phyllodes tumor, n = 1); PTC**, (including papillary carcinoma, n = 10; and tubular carcinoma, n = 3); CSS, carcinosarcoma.

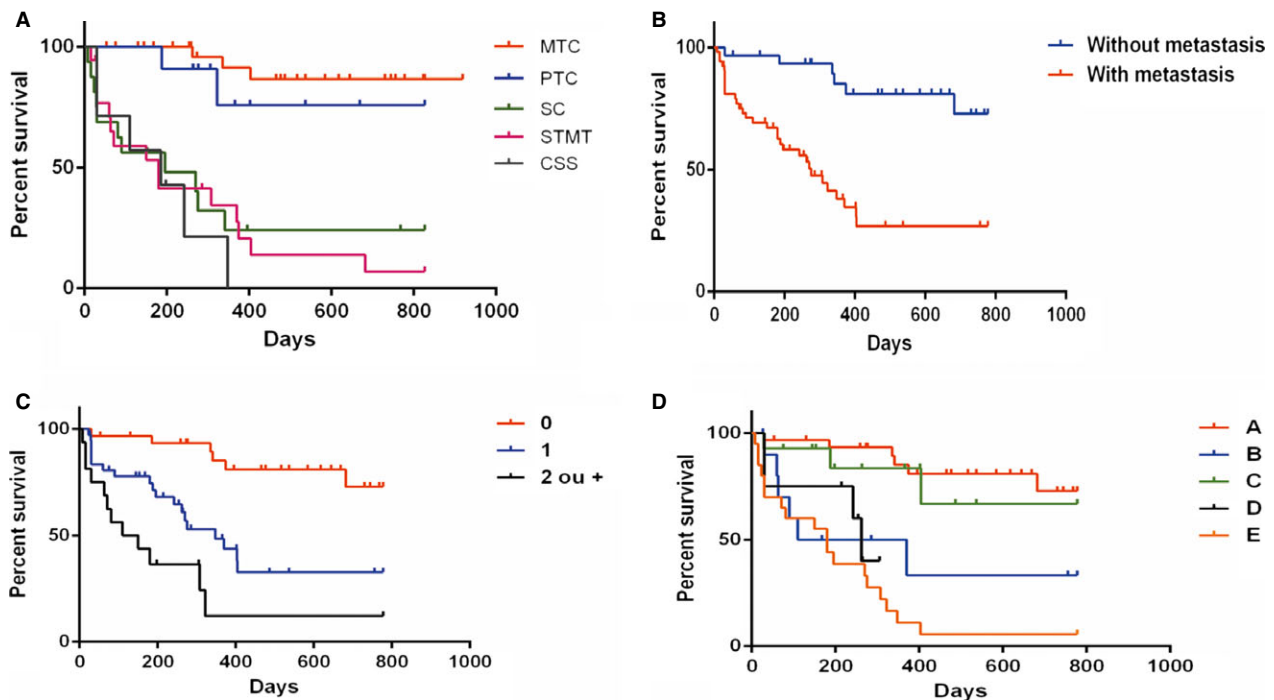


Fig 2. (A) Kaplan–Meier survival curve for the animals according to the histologic types: MTC (carcinoma in mixed tumor; $n = 32$); PTC (papillary and tubular carcinoma; $n = 11$); SC (solid carcinoma; $n = 16$; median, 195 days); RTMT (rare type malignant mammary tumors; $n = 18$; median, 180 days); and CSS (carcinosarcoma; $n = 7$; median, 185 days). Animals with MTC and PTC not did reach median survival ($P < .0001$). (B) Kaplan–Meier survival curve for the animals with metastasis ($n = 53$, median, 275 days) and without metastasis ($n = 31$, not reaching median survival) ($P < .0001$). (C) Kaplan–Meier survival curve for the animals according to the number of lymph nodes involved: 0 (no metastatic lymph nodes; $n = 31$, not reaching median survival), 1 (1 metastatic lymph node; $n = 37$; median, 348 days), and ≥ 2 (≥ 2 metastatic lymph nodes; $n = 16$; median, 130 days) ($P < .0001$). (D) Kaplan–Meier survival curve for the animals according to the classification of metastasis: A (absence of metastasis; $n = 31$), B (macrometastases; $n = 11$; median, 240 days), C (micrometastases; $n = 14$), D (isolated tumor cells; $n = 8$; median, 262 days), and E (no measurable metastasis; $n = 20$; median, 180 days) ($P < .01$). The animals in groups A and C did not reach median survival.

macrometastases (group B; mean, 248.8 ± 277.8 days and median, 240 days) had lower survival times than those without metastasis (group A; mean, 497.6 ± 238.37 days and not reaching median survival) and those with micrometastases (group C; mean, 342.9 ± 238.9 days and not reaching median survival). Lower survival with statistical significance was observed in animals from groups B \times A ($P = .002$), D \times A ($P = .001$) and E \times A ($P < .0001$) and in animals from group E relative to group C ($P < .001$; Fig 2D).

Stratification of animals with measurable metastasis (i.e., macrometastases, micrometastases, and ITC) distributed in groups according to the area of metastasis, number of metastatic foci, maximum diameter, and TMA is presented in Table 1.

The mean area of metastasis was 2.95 mm^2 (range, $0.0001\text{--}169.88 \text{ mm}^2$; SD, 17.16 mm^2 ; $n = 33$). When stratified by area, animals with areas $<20.11 \text{ mm}^2$ (mean, 207.1 ± 93.4 days and not reaching median survival) had a greater survival than those with areas $>20.11 \text{ mm}^2$ (mean, 103.0 ± 107.1 days and median, 86.5 days; $P = .0457$; Fig 3A).

The mean number of metastatic foci was 10 (range, 1–97 foci; SD, 18 foci; $n = 33$). There were no statistically significant differences in the survival of animals

with <28 foci (mean, 237.1 ± 174.5 days and median, 404 days) and >28 foci (mean, 361.3 ± 155.3 days and not reaching median survival; Fig 3B).

The mean maximum diameter of the metastases was 2.86 mm (range, 0.06–16.92 mm; SD, 4.46 mm; $n = 33$). When stratified by maximum diameter, the survival of animals with diameters $>7.32 \text{ mm}$ (mean, 95.8 ± 97.4 days and not reaching median survival) was lower than animals with diameters $<7.32 \text{ mm}$ (mean, 212.6 ± 90.6 days and median, 63 days; $P = .0068$; Fig 3C).

Finally, the mean TMA obtained for animals with >1 metastatic focus was 26.04 mm^2 (range, $0.0196\text{--}239.41 \text{ mm}^2$; SD, 62.88 mm^2 ; $n = 24$). When stratified by TMA, no significant difference was found in survival of the animals with TMAs $<88.92 \text{ mm}^2$ (mean, 303.3 ± 210.1 days and not reaching median survival) and with TMAs $>88.92 \text{ mm}^2$ (mean, 317.0 ± 399.9 days and median, 110 days; Fig 3D).

Discussion

As in women, regional lymph node status has major impact on survival in dogs with mammary tumors.^{22–27} In the present study, animals with metastasis had lower survival times than did animals without metastasis.

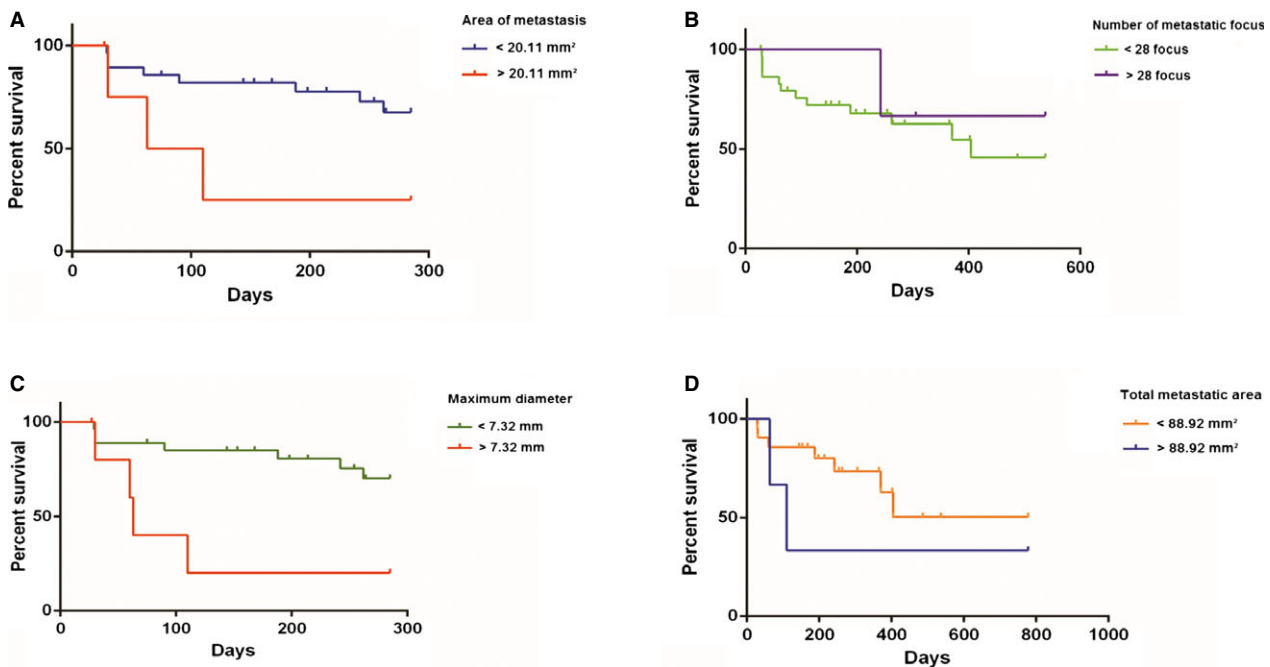


Fig 3. (A) Kaplan–Meier survival curve for the animals according to the area of metastasis: $<20.11 \text{ mm}^2$ ($n = 28$; not reaching median survival) and $>20.11 \text{ mm}^2$ ($n = 5$; median, 86.5 days) ($P = .0457$). (B) Kaplan–Meier survival curve for the animals according to the number of metastatic foci: <28 foci ($n = 30$; median, 404 days) and >28 foci ($n = 3$; not reaching median survival) ($P = .629$). (C) Kaplan–Meier survival curve for the animals according to the maximum diameter of metastasis: $<7.32 \text{ mm}$ ($n = 27$; not reaching median survival) and $>7.32 \text{ mm}$ ($n = 6$; median, 63 days) ($P = .0068$). (D) Kaplan–Meier survival curve for the animals according to the total metastatic area (TMA): $<88.92 \text{ mm}^2$ ($n = 21$; not reaching median survival) and $>88.92 \text{ mm}^2$ ($n = 3$; median, 110 days) ($P = .3329$).

These findings are similar to those reported in the literature.^{22–26}

To our knowledge, this study is the first to describe the prognostic significance of identifying a higher number of lymph nodes positive for metastasis in dogs, as has been reported in humans.^{1,39} Another novel aspect is the use of a more accurate technique for measuring metastases, which yields a more detailed representation of the metastatic load of the lymph nodes in these animals. In this study, dogs with lymph node metastases with diameters $>7.32 \text{ mm}$ had lower overall survival. Another interesting finding was that the presence of ITC in the lymph nodes of dogs with malignant mammary tumors was associated with lower overall survival in comparison to dogs with no metastatic malignant mammary tumors.

Histological type is one of the most important prognostic factors in dogs with mammary tumors and, our results are similar to those described in the literature.^{23,24} We found that solid carcinomas are extremely aggressive histologically and have a worse prognosis compared with histologically well-differentiated tumors, such as carcinomas in mixed tumors, papillary carcinoma, and tubular carcinoma. Tumors subclassified as micropapillary carcinomas were particularly noteworthy in this study. These tumors were associated with lower overall survival compared with other tumors, as described in previous studies.^{40–43}

In this study, metastatic involvement of >1 lymph node showed a direct correlation with worse prognosis.

This parameter may become an important prognostic factor in veterinary clinical practice and has not previously been described in dogs. In women, a higher number of affected axillary lymph nodes is associated with shorter survival times, which is a well-recognized prognostic factor in breast cancer.^{1,39}

The presence of lymph node macrometastases is also a clinically relevant prognostic factor in dogs with mammary tumors.³⁶ However, a novel finding of similar prognostic relevance was the identification of isolated cells in these animals. In this study, 33.33% of the animals diagnosed with ITC had more aggressive tumors, such as carcinosarcoma and solid carcinoma. Such behavior may be similar to that observed in women with breast cancer, in whom the clinical relevance of identifying cell clusters $<0.2 \text{ mm}$ has shown conflicting results and may be directly related to the histologic type studied.^{13,16,18,21}

The differences in animal survival demonstrate that metastatic area measurements can be used to characterize regional lymph node metastases in female dogs with malignant mammary tumors. However, this characterization may not be practical in routine laboratory pathology because it would be necessary to measure all metastatic foci to obtain the mean metastatic area.

The maximum diameter of metastases currently is used to classify metastases as macrometastases, micrometastases, or ITC in humans.⁷ In the present study, the classification of metastasis used in humans was made, along with stratification to the maximum diameter

(cut-off: mean plus SD = 7.32 mm). Lower survival was observed in animals with a maximum diameter of lymph node metastasis >7.32 mm relative to animals with a maximum diameter of lymph node metastasis <7.32 mm. Thus, the behavior of macrometastases and staging in dogs can vary, and the current classification system based on humans (macrometastases: metastasis >2 mm) may not be the most appropriate. Other authors have discussed the use of classification systems other than the classification systems used in humans that have been adapted to veterinary medicine.³⁵ A sub-classification system for macrometastases should be considered because the lymph node metastasis can reach considerable size in female dogs, similar to findings in the present study.

The TMA measurements in SLNs can predict non-SLN metastasis in women with breast cancer.⁸ The present study found no differences in animal survival between a TMA (cut-off: mean plus SD) >88.92 mm² and a TMA <88.92 mm². Thus, to obtain prognostic information, we consider that the maximum diameter measurement could be one of the most suitable methods when analyzing single sections of lymph nodes in female dogs with malignant mammary tumors.

In the clinical studies of humans, substantial advances are described in relation to the standardization of gross sectioning and the number of histologic sections to be analyzed in SLNs of women with breast cancer.⁴⁴ In veterinary medicine, evaluating lymph node metastases, determining the prognostic value of metastatic size, and even establishing the number of histologic sections to be analyzed should be investigated in additional studies, especially when using SLN mapping in mammary tumors of dogs. The findings in this study may help in future proposals for the standardization of these methods of analysis, showing the real prognostic relevance of the occurrence of lymph node metastasis in malignant mammary tumors of dogs.

Corroborating previous findings,^{22–26} our study showed that the presence of lymph node metastasis is a negative prognostic factor. However, the analysis of these data with tumor size, histologic type, mitotic index, histologic grading, status of hormonal receptors, and cell proliferation markers may provide more consistent information in a multivariate analysis of the possible independent prognostic factors in dogs with malignant mammary tumors and may provide actual practical applications for the data presented in this study for clinical practice. However, the independent prognostic relevance of lymph node status in dogs with mammary tumors is still poorly established in multivariate analysis.^{23,45,46}

Conclusions

The identification of ≥ 1 metastatic lymph nodes is considered a parameter for prognostic assessment in affected animals. Moreover, macrometastases and ITC in regional lymph nodes are associated with a worse prognosis in dogs with malignant mammary tumors subjected only to surgical treatment. A more detailed

classification system and staging that takes into account differences in the sizes of macrometastases identified in female dogs should be considered, and additional studies should be conducted to confirm these findings.

Footnotes

^a Dako, Carpinteria, CA.

^b NeoMarkers Inc., Fremont, CA.

^c Thermo Fisher Scientific, LabVision Corporation, Fremont, CA.

Acknowledgments

Grant support: This work was financially supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Brazil.

Conflict of Interest Declaration: Authors disclose no conflict of interest.

Off-label Antimicrobial Declaration: Authors declare no off-label use of antimicrobials.

References

1. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989;63:181–187.
2. Veronesi U, Paganelli G, Viale G, et al. A randomized comparison of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer. *N Engl J Med* 2003;349:546–553.
3. Lyman GH, Temin S, Edge SB, et al. Sentinel lymph node biopsy for patients with early-stage breast cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 2014;32:1365–1383.
4. Kuehn T, Bembenek A, Decker T, et al. A concept for the clinical implementation of sentinel lymph node biopsy in patients with breast carcinoma with special regard to quality assurance. *Cancer* 2005;103:451–461.
5. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:966–978.
6. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, et al. Thresholds for therapies: Highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer. *Ann Oncol* 2009;20:1319–1329.
7. Greene FL, Page DL, Fleming ID, et al. Breast. In: Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz A, Balch CM, Haller DG, Morrow M, eds. *AJCC Cancer Staging Manual*, 6th ed. New York: Springer; 2002:223–240.
8. Chae AW, Vandewalker KM, Li YJ, et al. Quantitation of sentinel node metastatic burden and Her-2/neu over-expression accurately predicts residual axillary nodal involvement and extranodal disease in breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 2013;39:627–633.
9. Fisher ER, Palekar A, Rockette H, et al. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (Protocol No. 4). V. Significance of axillary nodal micro and macrometastases. *Cancer* 1978;42:2032–2038.
10. Fisher B, Gebhardt MC. The evolution of breast cancer surgery: Past, present, and future. *Semin Oncol* 1978;5:385–394.

11. Cote R, Peterson H, Chaiwun B, et al. Role of immunohistochemical detection of lymph-node metastases in management of breast cancer. *Lancet* 1999;354:896–900.
12. Viale G, Maiorano E, Pruneri G, et al. Predicting the risk for additional axillary metastases in patients with breast carcinoma and positive sentinel lymph node biopsy. *Ann Surg* 2005;241:319–325.
13. Cserni G, Bianchi S, Vezzosi V, et al. Variations in sentinel node isolated tumour cells/micrometastases and non-sentinel node involvement rates according to different interpretations of the TNM definitions. *Eur J Cancer* 2008;44:2185–2191.
14. Nagashima T, Sakakibara M, Nakano S, et al. Sentinel node micrometastases and distant failure in breast cancer patients. *Breast Cancer* 2006;13:186–191.
15. Langer I, Marti WR, Guller U, et al. Axillary recurrence rate in breast cancer patients with negative sentinel lymph node (SLN) or SLN micrometastases. *Ann Surg* 2005;241:152–158.
16. Imoto S, Ochiai A, Okumura C, et al. Impact of isolated tumor cells in sentinel lymph nodes detected by immunohistochemical staining. *Eur J Surg Oncol* 2006;32:1175–1179.
17. Cserni G, Amendoeira I, Apostolikas N, et al. Pathological work-up of sentinel lymph nodes in breast cancer. Review of current data to be considered for the formulation of guidelines. *Eur J Cancer* 2003;39:1654–1667.
18. De Boer M, Van Deurzen CH, Van Dijck JA, et al. Micrometastases or isolated tumor cells and the outcome of breast cancer. *N Engl J Med* 2009;361:653–663.
19. Patani N, Mokbel K. The clinical significance of sentinel lymph node micrometastases in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2009;114:393–402.
20. Patani N, Mokbel K. Clinical significance of sentinel lymph node isolated tumour cells in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2011;127:325–334.
21. Ahmed SS, Thike AA, Iqbal J, et al. Sentinel lymph nodes with isolated tumour cells and micrometastases in breast cancer: Clinical relevance and prognostic significance. *J Clin Pathol* 2014;67:243–250.
22. Kurzman ID, Gilbertson SR. Prognostic factors in canine mammary tumors. *Semin Vet Med Surg (Small Animal)* 1986;1:25–32.
23. Hellmén E, Bergström R, Holmberg L, et al. Prognostic factors in canine mammary tumors: A multivariate study of 202 consecutive cases. *Vet Pathol* 1993;30:20–27.
24. 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;58:1079–1083.
25. Pérez Alenza MD, Peña L, Nieto AI, Castaño M. Clinical and pathological prognostic factors in canine mammary tumors. *Ann Ist Super Sanita* 1997;33:581–585.
26. Nieto A, Peña L, Pérez-Alenza MD, et al. Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: Clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Vet Pathol* 2000;37:239–247.
27. Chang SC, Chang CC, Chang TJ, Wong ML. 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;227:1625–1629.
28. Patsikas MN, Karayannopoulou M, Kaldrymidoy E, et al. The lymph drainage of the neoplastic mammary glands in the bitch: A lymphographic study. *Anat Histol Embryol* 2006;35:228–234.
29. Beserra HEO, Grandi F, Ibañez JF, et al. Sentinel lymph node identification: The importance of new methodologies and preclinical studies in dogs. *Braz J Vet Pathol* 2013;6:5.
30. Daleck CR, Franceschini PH, Alessi AC, et al. Canine mammary neoplasia: Clinical and surgical evolution. *Cienc Rural* 1998;28:95–100.
31. Morrison WB. Canine and feline mammary tumors. In: Morrison WB, ed. *Cancer in Dogs and Cats: Medical and Surgical Management*, 1st ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 1998:591–598.
32. Novosad CA. Principles of treatment for mammary gland tumors. *Clin Tech Small Anim Pract* 2003;18:107–109.
33. Cassali GD, Lavalle GE, Ferreira E, et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors – 2013. *Braz J Vet Pathol* 2014;7:38–69.
34. Sorenmo KU, Worley DR, Goldschmidt MH. Tumors of the mammary gland. In: Withrow SJ, Vail DM, Page RL, eds. *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, 5th ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier; 2013:538–556.
35. Matos AJ, Faustino AM, Lopes C, et al. Detection of lymph node micrometastases in malignant mammary tumours in dogs by cytokeratin immunostaining. *Vet Rec* 2006;158:626–630.
36. Szczubial M, Lopuszynski W. Prognostic value of regional lymph node status in canine mammary carcinomas. *Vet Comp Oncol* 2011;9:296–303.
37. Misdorp W, Else RW, Hellmen E. *Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat*. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1999.
38. Araújo MR, Damasceno KA, Gamba CO, et al. Morphological and immuno-histochemical characterization of five phyllodes mammary gland tumors in dogs. *Onl J Vet Res* 2014;18:688–695.
39. Silverstein MJ, Gierson ED, Waisman JR, et al. Axillary lymph node dissection for T1a breast carcinoma. Is it indicated?. *Cancer* 1994;73:664–667.
40. Cassali GD, Gärtner F, Vieira da Silva MJ, Schmitt FC. Cytological diagnosis of a metastatic canine mammary tumor in pleural effusion. *Arq Bras Med Vet Zootec* 1999;51:307–310.
41. Cassali GD, Serakides R, Gartner F, Schmitt FC. Invasive micropapillary carcinoma of the dog mammary gland. A case report. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2002;54:366–369.
42. Gama A, Alves A, Schmitt FC. Clinicopathologic features of mammary invasive micropapillary carcinoma (IMC) in dogs. *Vet Pathol* 2008;45:600–601.
43. Gamba CO, Dias EJ, Ribeiro LG, et al. Histopathological and immunohistochemical assessment of invasive micropapillary mammary carcinoma in dogs: A retrospective study. *Vet J* 2013;196:241–246.
44. Weaver DL. Pathology evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer: Protocol recommendations and rationale. *Mod Pathol* 2010;23(Suppl 2):S26–S32.
45. De Las Mulas JM, Millán Y, Dios R. A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor alpha and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. *Vet Pathol* 2005;42:200–212.
46. Santos AA, Lopes CC, Ribeiro JR, et al. Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: A multivariable survival study. *BMC Vet Res* 2013;9:1.

ARTIGO 2

HER-2, EGFR, Cox-2 and Ki67 expression in lymph node metastasis of canine mammary carcinomas: association with clinical-pathological parameters and overall survival

Submetido para publicação no periódico The Veterinary Journal

Original Article

HER-2, EGFR, Cox-2 and Ki67 expression in lymph node metastasis of canine mammary carcinomas: association with clinical-pathological parameters and overall survival

M. R. Araújo^a, L. C. Campos^a, K. A. Damasceno^a, C. O. Gamba^a, E. Ferreira^a, G. D. Cassali^{a,*}

^a*Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brazil.*

Corresponding author. Tel.: 055 31 34092891.

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

Abstract

Studies about canine mammary tumors based on single molecular markers probably cannot accurately account for the heterogeneity of this disease, and the investigation of multiple molecular alterations in primary tumors and their metastases, in conjunction, has assumed great importance for the understanding of mammary tumor progression. In the present study, we selected 54 primary mammary carcinomas with lymph node metastasis (T1,2,3N1M0), 29 primary mammary carcinomas without metastasis (T1,2,3N0M0), and 25 canine lymph nodes metastasis to evaluate the immunohistochemical expression of HER-2, EGFR, Cox-2 and Ki67 and its association with clinical-pathological parameters and overall survival. Our results found a concordance between the expression of HER-2 (K coefficient: 0.250), Cox-2 (K coefficient: 0.571), and Ki67 (K coefficient: 0.397) and a discordance between EGFR expression (K coefficient: -0.195) in primary mammary carcinomas and paired lymph node metastasis. Furthermore, a high Ki67 index (>24%), large tumor size and the presence of angiolymphatic invasion in canine primary mammary carcinoma with lymph node metastasis plus the presence of extracapsular extension in lymph nodes metastasis were also related to worse prognoses and shorter overall survival ($P<0.05$). In conclusion, our study demonstrates that primary mammary carcinomas with high expression of HER-2, Cox-2 and Ki67 also show high expression of these markers in paired lymph node metastasis. Moreover, the expression of these molecular markers in lymph nodes metastasis did not demonstrate a prognostic relevance.

Key words: mammary carcinomas; canine; lymph node metastasis; immunohistochemistry; survival

Introduction

As described in both canine and human mammary carcinomas, changes in genes encoding growth factors, growth factor receptors and other regulators of cellular proliferation might play a role in tumorigenesis and therapeutic response (Sorlie et al., 2001). Studies based on single molecular markers cannot accurately account for the heterogeneity of mammary carcinomas (Sorlie et al., 2001; Gama et al., 2008). Given the large number of cellular events involved in cell growth, differentiation, proliferation, invasion and metastasis, the investigation of multiple molecular alterations in conjunction has great relevance for the understanding of mammary carcinoma progression (Argyle and Khanna, 2013). Recently, the evaluation of molecular markers has been also applied to study of lymph nodes metastasis from human and canine mammary tumors (Cho et al., 2008; De Matos et al., 2007; Beha et al., 2012). As in women, regional lymph node status has a major impact on survival in dogs with mammary carcinomas (Hellmén et al., 1993; Yamagami et al., 1996; Chang et al., 2005; Araújo et al., 2015).

Mammary carcinomas can develop and progress by a stepwise accumulation of genetic changes, exposure to growth factors, or sex hormones. Among these genetic alterations, amplification of the *erbB* oncogenes, especially the human epidermal growth factor receptor genes *erbB-1* (EGFR, HER-1) and *erbB-2* (HER-2, *c-erb B 2*, HER-2/neu), have been shown to play a fundamental role in the progression of breast cancer and other solid tumors (Slamon et al., 1987; Baccus et al., 1994).

HER-2 gene amplification or HER-2 protein overexpression has been identified in approximately 30% of human breast cancers and it has been shown to be associated with poor prognosis and prediction of therapeutic response (Slamon et al., 1987; Vogel et al., 2002). In

dogs, the prognostic relevance of HER-2 protein expression in mammary carcinomas has yet to be determined. Different authors have shown that the HER-2 protein overexpression in canine mammary carcinomas has been associated with worse prognosis; however, other studies have failed to demonstrate a prognostic relevance of HER-2 protein overexpression (De las Mulas et al., 2003; Hsu et al., 2009; Ressel et al., 2013).

EGFR has been expressed between 20% to 30% of human breast cancers and some studies have associated EGFR expression with poor clinical outcome (Aziz et al., 2002; Tsutsui et al., 2002). Elevated EGFR serum levels and high expression have also been detected in canine mammary carcinomas using different methodologies, and its expression immunohistochemical has been associated with malignancy (Gama et al., 2009; Bertagnolli et al., 2011; Carvalho et al., 2013; Kim et al., 2013). However, the relevance of EGFR expression as an independent prognostic factor in human or dogs is still controversial (Rampaul et al., 2004; Kim et al., 2013).

Unlike HER-2 and EGFR, other molecules such as Cox-2 and Ki67 are well-recognized prognostic factors in most studies concerning canine mammary carcinomas. Cox-2 expression and a high cell proliferation index (Ki67) have been associated with disease progression, poor prognosis and a shorter survival time in dogs with mammary carcinomas (Dutra et al., 2008; Lavalle et al., 2009; Penã et al., 1998; Millanta et al., 2006; Queiroga et al., 2010; Santos et al., 2013). Nevertheless, data regarding the expression of these biomarkers in lymph node metastasis of canine mammary carcinomas are very limited (Pereira et al., 2009).

Due to the high incidence, clinical importance and new therapies targeted to canine mammary carcinomas, there is an increasing interest in prognostic and predictive biomarkers for the evaluation of tumor progression. In the present study, we evaluated the immunohistochemical expression of HER-2, EGFR, Cox-2 and Ki67 and its association with clinical-pathological parameters and overall survival in canine primary mammary carcinomas with and without metastasis and in paired lymph node metastasis.

Materials and methods

All procedures were performed under the guidelines and with the approval of the Ethics Committee in Animal Experimentation at the Federal University of Minas Gerais (UFMG), protocol 174/2011.

Samples

Canine mammary carcinomas were selected from the Veterinary School of the Federal University of Minas Gerais and the Laboratory of Comparative Pathology at the Institute of Biological Sciences at the Federal University of Minas Gerais. The cases were staged according to the tumor-node-metastasis (TNM) clinical staging system for canine mammary tumors: this system evaluates tumor size (T1, 0–3 cm; T2, 3–5 cm; T3, >5 cm); the involvement of regional lymph nodes (N0, no metastasis; N1, metastasis), and the presence of distant metastasis (M0, no metastasis; M1, metastasis). Cases were then categorized into five stages: I (T1N0M0); II (T2N0M0); III (T3N0M0); IV (T1,2,3N1M0); and V (T1,2,3N0,1M1) (Owen, 1980). The presence of lymph node metastasis was diagnosed through hematoxylin-eosin (H&E) routine staining and was confirmed by immunohistochemistry (IHC) (cytokeratin AE1/AE3 and/or vimentin). To rule out distant metastasis at time of diagnosis, all dogs were underwent thoracic radiography and abdominal ultrasound examination only when

serum biochemical changes or increased abdominal size were observed. The cases that displayed systemic metastases were excluded, and 54 cases of primary mammary carcinomas with lymph node metastasis (N1) and 29 primary mammary carcinomas without lymph node metastasis (N0) were selected. Of the 54 cases of primary mammary carcinomas with lymph node metastasis, a total of 99 lymph nodes were evaluated and diagnosed metastasis in 76 lymph nodes. However, in only 25 lymph nodes metastasis (of 25 cases) was possible an evaluation of the tumor markers.

Histopathology

All tumors and lymph node specimens were previously fixed in 10% neutral buffered formalin, paraffin-embedded and routinely prepared and stained with H&E. Tumors were classified according to the veterinary histological classification (Cassali et al., 2014; Misdorp et al., 1999). Furthermore, tumors were graded according to the Nottingham Grading System (Elston e Ellis, 1998) and 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 presence and the number of lymph node affected with extracapsular extension (ECE) (the presence of neoplastic cells through the capsule of the lymph node metastasis into the perinodal tissue) were evaluated.

Immunohistochemistry

Consecutive 3 µm thick sections of primary mammary carcinomas (N0 and N1) and lymph nodes metastasis were cut for IHC analysis, and the antigen was immunodetected using the Dako Advance (HRP) Visualization Method (Dako, Carpinteria, CA, USA). Endogenous peroxidase activity was blocked with a 3% hydrogen peroxide solution in methyl alcohol. The reagents were applied manually and immunoreactivity was visualized with the chromogen

diaminobenzidine (DAB Substrate System, Dako, Carpinteria, CA, USA) Details of the antibodies, dilutions, antigen retrieval procedures, and incubation times used are provided in Table 1. The cytokeratin (CK) AE1/AE3 was used to confirm the presence of metastasis. Sections from the HER-2, EGFR and Cox-2, positive canine mammary carcinoma were used as positive controls. Negative controls were assessed using normal serum (Ultra V Block, Laboratory Vision) as the primary antibody.

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.

EGFR expression was evaluated by adapted criteria HER-2 assessment (Wolff et al., 2013) and specimens with scores of 0, 1+ and 2+ were regarded as negative, and score of 3+ were defined as positive.

Positivity for Cox-2 was indicated by cytoplasmic staining. The number of Cox-2 positive cells was evaluated semi-quantitatively, with the distribution score defined by the estimated percentage of positive cells in 5 fields at 400X magnification: 0 = absent, 1 = $< 10\%$ of cells were stained, 2 = between 10% and 30% of cells were stained, 3 = between 31% and 60% of cells were stained, 4 = more than 61% of cells were stained. To evaluate staining

intensity, values from 0 to 3 were attributed: 0 = absence (-), 1 = weak staining (+), 2 = moderate staining (++), and 3 = strong staining (+++). The distribution score and intensity were multiplied to obtain a total score, which ranged from 0 to 12, with scores from 0 to 5 considered low and scores from 6 to 12 considered high (Lavalle et al., 2009).

The cell proliferative index was calculated by counting the number of nuclei positive for Ki-67 staining in a total of 1000 neoplastic cells from each lesion in hot spot areas (Dutra et al., 2008). A cut-off of 24% positive neoplastic cells for the analysis of Ki67 was used (Penã et al., 1998), with >24% Ki67 index considered to be a high cell proliferation index and < 24% Ki67 index considered to be a low cell proliferation index.

Overall survival

The overall survival was defined as the period (in days) between surgical tumor removal and death due to the tumor. The follow-up period was 1370 days. Animals that died from unknown causes or from causes unrelated to the mammary tumor were censored.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with the software GraphPad Prism 6.0. The D'Agostino & Pearson omnibus normality test was used to determine if the data were normally distributed. The Mann–Whitney and unpaired t tests were used to compare the Ki67 index means and size tumor. Possible correlations were investigated by Spearman tests and the associations were described by Chi-square and Fisher's exact tests. The survival curves were calculated with the Kaplan–Meier estimate using the log-rank test. Values were considered statistically significant when $P < 0.05$.

The agreement between the HER-2, EGFR, Cox-2 and Ki67 status of primary tumors and paired lymph node metastasis was expressed by the Cohen Kappa coefficient using the software GraphPad Prism QuickCalcs. The relation between the values and the levels of agreement were those used by Landis and Koch (1977) with values of 0.00–0.20 indicating slight agreement, values of 0.21–0.40 indicating fair agreement, values of 0.41–0.60 indicating moderate agreement, values of 0.61–0.80 indicating substantial agreement, and values of 0.81–1.00 indicating almost perfect agreement.

Results

Clinical-pathological parameters in canine primary mammary carcinomas and regional lymph nodes

The clinical-pathological features of the animals with primary mammary carcinoma without metastasis (N0) and with lymph node metastasis (N1) are summarized in Table 2. The ages of the animals at the time of surgery ranged from 4 to 16 years with a mean of 10.88 ± 2.7 years and 10.51 ± 2.9 years in dogs with lymph node metastasis and without metastasis, respectively ($P > 0.05$).

The anatomic location of the carcinomas was more frequent in inguinal glands in dogs with lymph node metastasis (16/28, 57.1%) and in caudal abdominal glands in dogs without metastasis (13/25, 52%) ($P = 0.02$). The thoracic location was observed only in three primary mammary carcinomas with lymph node metastasis.

Higher frequency of carcinoma in mixed tumors (21/32, 65.6%) in dogs without metastasis and of non-mixed tumors and carcinosarcomas (43/51, 84.3%) in dogs with lymph

node metastasis ($P < 0.001$) were observed. Grade I (12/19, 63.2%) was more predominant in primary mammary carcinomas without metastasis and grade II (29/44, 65.9%) and grade III (17/19, 89.5%) were more predominant in primary mammary carcinomas with lymph node metastasis ($P < 0.01$).

The tumor size ranged from 0.5 to 10 cm (mean of 3.62 ± 2.49 cm) in primary mammary carcinoma without metastasis and from 0.4 to 15 cm (mean of 5.39 ± 3.53 cm) in primary mammary carcinoma with lymph node metastasis ($P = 0.02$). Angiolymphatic invasion (22/27, 81.5%) was more frequent in primary mammary carcinoma with lymph node metastasis than primary mammary carcinoma without metastasis ($P < 0.01$).

In the lymph node histological analysis, ECE was identified in 42.1% (32/76) of the lymph nodes metastasis. Additionally, ECE was observed in 40.74% (22/54) of cases of primary mammary carcinomas studied. In 68.2% (15/22) and in 31.8% (7/22) of these cases, one lymph node and ≥ 2 lymph nodes with ECE, respectively, were observed.

In primary mammary carcinoma without metastasis, high histological grade correlated with larger tumors ($r = 0.45$, $P = 0.01$) and with the presence of angiolymphatic invasion ($r = 0.41$, $P = 0.02$). Furthermore, the presence of angiolymphatic invasion was correlated with larger tumors ($r = 0.47$, $P = 0.01$).

In primary mammary carcinoma with lymph node metastasis, the presence of angiolymphatic invasion was correlated with high histological grade ($r = 0.40$, $P = 0.003$), with the presence of ECE ($r = 0.53$, $p < 0.001$) and with a high number of lymph nodes with ECE ($r = 0.48$, $P < 0.001$).

Molecular parameters in primary mammary carcinomas with lymph node metastasis and without metastasis

The immunohistochemical data of the primary mammary carcinomas with lymph node metastasis and without metastasis are summarized in Table 3. There was no significant difference in the frequency of the expression of all markers between primary mammary carcinomas with lymph node metastasis and without metastasis. The mean expression of the Ki67 index in primary mammary carcinomas with lymph node metastasis and without metastasis was of $26.33\pm 19.80\%$ and $19.27\pm 22.03\%$, respectively ($P>0.05$).

In primary mammary carcinomas with lymph node metastasis, the HER-2-positive tumors were positively correlated with a high cell proliferation index ($r=0.32$; $P=0.03$).

Relationship between the molecular parameters in primary mammary carcinomas and in lymph node metastasis

The lymph node metastasis immunohistochemical data are also summarized in Table 3. A higher frequency of positivity of HER-2 in lymph node metastasis was observed in relation to primary mammary carcinomas ($P=0.01$).

The mean expression of Ki67 index in primary mammary carcinomas and in lymph node metastasis was of $26.33\pm 19.80\%$ and $28.91\pm 20.79\%$, respectively ($P>0.05$).

The HER-2, EGFR, Cox-2 and Ki67 status of the primary mammary carcinomas and paired lymph nodes metastasis are shown in Table 4. The HER-2 status of the primary mammary carcinomas and paired lymph nodes metastasis was concordant in 15 of 21 cases

(71.4%), including 2 (9.5%) with positivity to HER-2 and 13 (61.9%) with negativity to this marker. The Cohen K coefficient was 0.25, indicating fair agreement. The EGFR status agreed in 14 of 21 cases (66.7%), all with negativity to EGFR. However, the Cohen K coefficient was -0.195, indicating discordance. The Cox-2 status agreed in 17 of 20 cases (85%), including 3 (15%) with high score and 14 (75%) with low score. The Cohen K coefficient was 0.571, indicating moderate agreement. Finally, Ki67 status agreed in 12 of 17 cases (70.6%), including 8 (47.1%) with a high cell proliferation index and 4 (23.5%) with a low cell proliferation index. The Cohen K coefficient was 0.397, indicating fair agreement.

Additionally, in the correlation analysis, high Cox-2 score in primary mammary carcinomas correlated with high Cox-2 score in lymph nodes metastasis ($r= 0.57$, $P= 0.008$).

Relationship between clinical-pathological and molecular parameters

In primary mammary carcinomas without metastasis, high histological grade correlated with a high cell proliferation index ($r=0.60$, $P= 0.004$) and positivity to HER-2 ($r=0.50$, $P=0.008$). Furthermore, positivity to EGFR correlated with the presence of angiolymphatic invasion ($r=0.40$, $P=0.03$) and with larger tumors ($r=0.52$, $P=0.007$).

In primary mammary carcinomas with lymph node metastasis, a high cell proliferation index correlated with presence of ECE ($r=0.37$, $P=0.008$) and a high number of lymph nodes with ECE ($r=0.39$, $P=0.006$).

Overall Survival

Survival data were available for 78 dogs. In total, 33 (42.3%) dogs died because of mammary carcinoma, 5 of which were euthanised because of the disease. Twenty eight

(35.9%) dogs were alive up between 152 and 1095 days post-surgery and 17 (21.8%) dogs died from causes unrelated to the mammary tumor between 27 and 1370 days post-surgery.

The mean overall survival of dogs with primary mammary carcinoma with lymph node metastasis and without metastasis was 351.56 ± 272.17 days and 552.04 ± 327.79 days ($P=0.004$), respectively. The log rank test showed longer overall survival of dogs with primary mammary carcinoma without metastasis (not reached the median survival time) than those with lymph node metastasis (median 395 days) ($P=0.002$) (Fig 1).

In dogs with primary mammary carcinoma with lymph node metastasis, shorter survival was correlated with high histological grade ($r= -0.32$, $P= 0.02$), the presence of angiolymphatic invasion ($r= -0.29$, $P= 0.04$), the presence of ECE ($r= -0.55$, $P<0.001$) and high number of lymph nodes with ECE ($r= -0.56$, $P<0.001$). However, no correlation between overall survival and clinical pathological parameters was observed in dogs with primary mammary carcinoma without metastasis.

In the survival curve analysis, a statistically significant difference in overall survival was observed with histological grade in dogs with primary mammary carcinoma without metastasis, with tumor size and ECE in dogs with primary mammary carcinoma with lymph node metastasis, and with angiolymphatic invasion in dogs with primary mammary carcinoma with lymph node metastasis and without metastasis.

When evaluated the primary mammary carcinomas with lymph node metastasis, a shorter overall survival was observed in dogs with T2 tumors (median 275 days, $P=0.02$) (Fig

2), with the presence of angiolymphatic invasion (median 188 days, $P=0.01$) (Fig 3) and with the presence of ECE (median 180 days, $P<0.0001$) (Fig 4).

A poor clinical outcome was associated with the presence of angiolymphatic invasion (median 341 days, $P=0.008$) (Fig 5) and with grade III tumors (median 263 days; $P=0.005$) in dogs with primary mammary carcinomas without metastasis (Fig 6).

There were not significant correlations between overall survival and tumor markers expression in dogs with primary mammary carcinomas with lymph node metastasis and without metastasis. These results were confirmed in survival curve analyses ($P>0.05$). However, a shorter overall survival of animals with high proliferative tumors (median 322 days) in relation to animals with a low proliferative tumors (not reached the median survival time) was observed in primary mammary carcinomas with lymph node metastasis ($P=0.03$) (Fig 7). Additionally, when the expression of HER-2, EGFR, Cox-2 and Ki67 was evaluated in lymph node metastasis, no significant difference was observed in the overall survival curve analysis ($P>0.05$).

Discussion

Primary mammary carcinomas with metastasis have a significant up-regulation of genes associated with cell cycle regulation, matrix modulation, protein folding and proteasomal degradation, and downregulation of differentiation genes, growth factor pathway genes and regulators of actin organization (Klopfleisch et al., 2010). In our study, the frequency of expression of HER-2, EGFR, Cox-2 and Ki67 did not differ significantly between primary mammary carcinomas with lymph node metastasis and without metastasis.

Some studies have demonstrated that the high frequency of HER-2 protein overexpression in in situ ductal carcinomas of the breast could be an early event in carcinogenesis (Xu et al., 2002). This fact can explain the similar frequency of this marker in the invasive primary carcinomas studied (with lymph node metastasis and without metastasis). However, lymph nodes metastasis (34.8%) had a significantly higher frequency of positivity to HER-2 compared to primary mammary carcinomas (8.3%). The epithelial phenotype is an event necessary in the formation of secondary tumors in lymph nodes (Hugo et al., 2007). HER-2 expression occurs mainly in neoplastic epithelial cells in a variety of solid tumors, including mammary tumors (Slamon et al., 1987; Baccus et al., 1994). Furthermore, one study demonstrated a correlation between the phenomenon of epithelial to mesenchymal transition in breast cancer and triple-negative tumors (HER-2 negative, estrogen and progesterone receptors negative) (Jeong et al., 2012). Therefore, our findings may suggest an important role of HER-2 overexpression in the mechanism related to the implantation of neoplastic cells in metastatic niches, such as the mesenchymal to epithelial transition in canine mammary tumors. Moreover, the biologic phenomenon of tumor heterogeneity described in breast cancer could explain the selection of HER-2-positive subclones in the metastasis observed in canine mammary tumors (Malinowsky et al., 2012; Niikura et al., 2012).

Another marker of the same family of human epidermal growth factor receptors, EGFR was not associated with survival in the present study or in the literature (Gama et al., 2009). In our series, we did not find a significant difference in the overall survival of dogs with positivity or negativity for EGFR when evaluated primary mammary carcinomas with

lymph node metastasis, primary mammary carcinomas without metastasis and lymph nodes metastasis. Furthermore, the frequency of EGFR expression did not differ between primary mammary carcinomas with lymph node metastasis and without metastasis. EGFR expression has been suggested to be an early event in the carcinogenesis of canine mammary carcinoma, which could explain the findings of the present study (Bertagnolli et al., 2011; Ferreira et al., 2012; Silva et al., 2014). However, an association between the positivity to EGFR and the presence of lymph node metastasis was observed by Guimarães et al., 2014 but not by Gama et al., 2009. These conflicting results may be related to the different analytic methods for evaluating EGFR expression in these studies. In our study, positivity to EGFR was correlated with the presence of angiolymphatic invasion and larger tumors in primary mammary carcinomas without metastasis. These findings are consistent with previous studies that found a correlation between positivity to EGFR and factors related to biologic aggressiveness such as larger tumors, high grade histologic, the presence of necrosis and the presence of lymphatic invasion (Carvalho et al., 2013; Gama et al., 2009; Kim et al., 2013; Guimarães et al., 2014).

To our knowledge, the present study is the first description of the overall survival of dogs with metastatic carcinoma according to Cox-2 expression in lymph node metastasis. Interestingly, a positive correlation between Cox-2 expression in primary tumors and lymph node metastasis was observed. However, in our study, there was not a significant difference in the frequency of the expression of Cox-2 in primary mammary carcinomas with lymph node metastasis and without metastasis. Few studies have found that the high expression of Cox-2 is associated with the presence of lymph node metastasis in dogs (Guimarães et al., 2014; Queiroga et al., 2010). An analysis of Cox-2 expression in canine metastatic lesions was presented only by Pereira et al., 2009. These authors found that in almost all cases, the labeling intensity of metastatic lesions (pulmonary and lymph node metastasis) was similar or

stronger than that of the primary, indicating that Cox-2 metabolic products contributing to metastatic spread of neoplastic cells.

Additionally, the present study did not demonstrate the prognostic relevance of Cox-2 expression when evaluated primary mammary carcinomas with lymph node metastasis, primary mammary carcinomas without metastasis and lymph nodes metastasis. Although the role of Cox-2 and its derived metabolites in tumorigenesis appears to be clear, the prognostic relevance of Cox-2 expression in cancer has not been clearly established (; Soslow et al., 2000; Surh et al., 2001; Lavalle et al., 2009). Some studies in veterinary medicine have found that dogs with mammary carcinoma and high Cox-2 expression have a shorter survival time (Milanta et al., 2006; Lavalle et al., 2009; Queiroga et al., 2010). In the current study, only 6 dogs with primary mammary carcinomas with lymph node metastasis had high Cox-2 score, which could explain our findings. Thus, the evaluation of Cox-2 in canine primary tumors and metastases should be investigated in additional studies using different molecular techniques.

In the present study, we demonstrated that Ki67 have prognostic relevance in dogs with primary mammary carcinomas with lymph node metastasis. A shorter overall survival of dogs with a high Ki67 index was also described in previous studies (Penã et al., 1998; Santos et al., 2013). Some multivariable studies, however, reported contrasting results, which may be explained by the fewer number of malignant tumors included in these studies (Lohr et al., 1997; Lee et al., 2004). In our series, a fair agreement between primary mammary carcinomas and paired lymph node metastasis was observed, and most of the concordant cases had high Ki67 index. Interestingly, 23.5% of the cases had a high cell proliferation index in the primary carcinomas but not in lymph node metastasis and 5.9% of the cases had a high cell proliferation index in lymph node metastasis but not in primary carcinomas. Using a cut-off of

24% for Ki67 was not observed significant difference in the frequency between primary mammary carcinomas with lymph node metastasis and without metastasis. Additionally, the frequency also did not differ between the primary carcinomas and lymph node metastasis. Thus, our results may suggest that the primary mammary carcinoma and paired lymph node metastasis are in general made up of cell populations with similar characteristics. Changes in the proliferative activity may occur during growth as a result of the selection of subpopulations with a high metastatic potential, due to the heterogeneity of the primary tumor, genotypic instability, or clonal proliferation during the process of metastasis (Kakeji et al., 1991). Furthermore, the association between the Ki67 index and the presence of lymph node metastasis is controversial in human and canine studies of mammary tumors (De Matos et al., 2006; Leonardi et al., 1992; Penã et al., 1998).

Interesting, in the current study, a significant correlation between a high Ki67 index in primary mammary carcinomas with lymph node metastasis and the presence of ECE and a high number of lymph nodes with ECE was found. Furthermore, dogs presenting lymph nodes with ECE had shorter overall survival in relation to those without ECE. The evaluation of extracapsular extension in the lymph nodes metastasis of dogs with mammary carcinomas is a novel aspect of the present study. This parameter has been studied in human breast cancer and its prognostic relevance has been proven (Yajima et al., 2015). In canine mammary tumors, ECE has not previously been described and our findings suggest that this feature could indicate more extensive disease and may explain the lower survival of these dogs.

Conclusions

Our study demonstrates that primary mammary carcinomas with lymph node metastasis, presenting a high expression of HER-2, Cox-2 and Ki67 also have a high

expression of these markers in paired lymph node metastasis. However, higher frequency of positivity to HER-2 in lymph node metastasis than in primary carcinomas was observed. Furthermore, a high Ki67 index, larger tumor size and the presence of angiolymphatic invasion in canine primary mammary carcinomas with lymph node metastasis and the occurrence of ECE in lymph nodes metastasis were also related to poor prognosis and shorter overall survival. Thus, our results suggest that the molecular parameters studied are associated or correlated with tumor aggressiveness and may be considered in future studies of canine mammary tumors and applied in clinical management.

Conflict of interest statement

None of the authors have any financial or personal relationships that could inappropriately influence or bias the content of this paper.

Acknowledgements

This work was financially supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Brazil.

References

- Araújo, M.R., Campos, L.C., Ferreira, E., Cassali G.D., 2015. Quantitation of the regional lymph node metastatic burden and prognosis in malignant mammary tumors of dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 29, 1360-1367.
- Argyle, D.J., Khanna, C., 2013. Tumor biology and metastasis. In: Withrow, S.J., Macewen's, E.G. *Small Clinical Veterinary Oncology*. Fifth Ed. Saunders Elsevier, St Louis, MO, USA, pp.30-50.
- Aziz, S.A., Pervez, S., Kayani, N., Rahbar, M.H., Khan, S., 2002. Epidermal growth factor receptor (EGFR) as a prognostic marker: an immunohistochemical study on 315 consecutive breast carcinoma patients. *Journal of Pakistan Medical Association* 52,104-110.

- Bacus, S.S., Zelnick, C.R., Plowman, G., Yarden, Y., 1994. Expression of the erbB-2 family of growth factor receptors and their ligands in breast cancers. Implication for tumor biology and clinical behavior. *American Journal of Clinical Pathology* 102, S13-24.
- Beha, G., Brunetti, B., Asproni, P., Muscatello, L.V., Millanta, F., Poli, A., Sarli, G., Benazzi, C., 2012. Molecular portrait-based correlation between primary canine mammary tumor and its lymph node metastasis: possible prognostic-predictive models and/or stronghold for specific treatments? *BMC Veterinary Research* 8, 219.
- Bertagnolli, A.C., Ferreira, E., Dias, E.J., Cassali, G.D., 2011. Canine mammary mixed tumours: immunohistochemical expressions of EGFR and HER-2. *Australian Veterinary Journal* 89, 312-317.
- Carvalho, M.I., Guimarães, M.J., Pires, I., Prada, J., Silva-Carvalho, R., Lopes, C., Queiroga, F.L., 2013. EGFR and microvessel density in canine malignant mammary tumours. *Research in Veterinary Science* 95, 1094-1099.
- Cassali, G.D., Lavalle, G.E., Ferreira, E., Estrela-Lima, A., De Nardi, A.B., Chever, C., Sobral, R.A., Amorin, 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* 7, 38-69.
- 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.
- Cho, E.Y., Han, J.J., Choi, Y.L., Kim, K.M., Oh, Y.L., 2008. Comparison of Her-2, EGFR and cyclin D1 in primary breast cancer and paired metastatic lymph nodes: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Journal of Korean Medical Science* 23, 1053-1061.
- De las Mulas, J.M., Ordás, J., Millán, Y., Fernández-Soria, V., Cajal, S.R., 2003. Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas. *Breast Cancer Research and Treatment* 80, 363-367.
- De Matos, A.J.F., Lopes, C.C.C., Faustino, A.M.R., Carvalheira, J.G.V., Rutteman, G.R., Gärtner, M.F.R.M., 2007. E-cadherin, β -catenin, invasion and lymph node metastases in canine malignant mammary tumours. *Acta Pathologica, Microbiologica Et Immunologica Scandinavica* 115, 327-334.
- De Matos, A.J.F., Lopes, C.C.C., Faustino, A.M.R., Carvalheira, J.G.V., Dos Santos, M.S.A., Rutteman, G.R., Gärtner, M.F.R.M., 2006. MIB-1 labelling indices according to clinico-pathological variables in canine mammary tumours: a multivariate study. *Anticancer Research* 26, 1821-1826.
- Dutra, A.P., Azevedo Júnior, G.M., Schmitt, F.C., Cassali, G.D., 2008. Assessment of cell proliferation and prognostic factors in canine mammary gland tumors. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 60, 1403-1412.

- Elston, C.W., Ellis, I.O., 1998. Assessment of histological grade. In: *The Breast*, Third Ed. Churchill Livingstone, London, UK, pp. 365–384.
- Ferreira, E., Gobbi, H., Saraiva, B.S., Cassali, G.D., 2012. Histological and immunohistochemical identification of atypical ductal mammary hyperplasia as a preneoplastic marker in dogs. *Veterinary Pathology* 49, 322-329.
- Gama, A., Alves, A., Schmitt, F., 2008. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Archives* 453, 123-132.
- Gama, A., Gärtner, F., Alves, A., Schmitt, F., 2009. Immunohistochemical expression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) in canine mammary tissues. *Research in Veterinary Science* 87, 432-437.
- Guimarães, M.J., Carvalho, M.I., Pires, I., Prada, J., Gil, A.G., Lopes, C., Queiroga, F.L., 2014. Concurrent expression of cyclo-oxygenase-2 and epidermal growth factor receptor in canine malignant mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology* 150, 27-34.
- Hellmén, E., Bergström, R., Holmberg, L., Spångberg, I.B., Hansson, K., Lindgren, A., 1993. Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. *Veterinary Pathology* 30, 20-27.
- Hsu, W.L., Huang, H.M., Liao, J.W., Wong, M.L., Chang, S.C., 2009. Increased survival in dogs with malignant mammary tumours overexpressing HER-2 protein and detection of a silent single nucleotide polymorphism in the canine HER-2 gene. *The Veterinary Journal* 180, 116-123.
- Hugo, H., Ackland, M.L., Blick, T., Lawrence, M.G., Clements, J.A., Williams, E.D., Thompson, E.W., 2007. Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions in carcinoma progression. *Journal of Cellular Physiology* 213, 374-383.
- Jeong, H., Ryu, Y.J., An, J., Lee, Y., Kim, A., 2012. Epithelial–mesenchymal transition in breast cancer correlates with high histological grade and triple-negative phenotype. *Histopathology* 60, E87-E95.
- Takeji, Y., Korenaga, D., Tsujitani, S., Haraguchi, M., Maehara, Y., Sugimachi, K., 1991. Predictive value of Ki-67 and argyrophilic nucleolar organizer region staining for lymph node metastasis in gastric cancer. *Cancer Research* 51, 3503-3506.
- 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.
- Klopfleisch, R., Lenze, D., Hummel, M., Gruber, A.D., 2010. Metastatic canine mammary carcinomas can be identified by a gene expression profile that partly overlaps with human breast cancer profiles. *BMC Cancer* 10, 618.

- Landis, J.R., Koch, G.G., 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33, 159-174.
- Lavalle, G.E., Bertagnolli, A.C., Tavares, W.L.F., Cassali, G.D., 2009. COX-2 expression in canine mammary carcinomas correlation with angiogenesis and overall survival. *Veterinary Pathology* 46, 1275-1280.
- Lee, C.H., Lim, J.H., Kim, D.Y., 2004. Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. *Journal of Veterinary Science* 5, 63-69.
- Leonardi E, Girlando S, Serio G, Mauri, F.A., Perrone, G., Scampini, S., Dalla Palma, P., Barbareschi, M., 1992. PCNA and Ki67 expression in breast carcinoma: correlations with clinical and biological variables. *Journal of Clinical Pathology* 45, 416-419.
- Löhr, C.V., Teifke, J.P., Failing, K., Weiss, E., 1997. Characterization of the proliferation state in canine mammary tumors by the standardized AgNOR method with postfixation and immunohistologic detection of Ki-67 and PCNA. *Veterinary Pathology* 34, 212-221.
- Malinowsky, K., Raychaudhuri, M., Buchner, T., Thulke, S., Wolff, C., Höfler, H., Becker, K.F., Avril, S., 2012. Common protein biomarkers assessed by reverse phase protein arrays show considerable intratumoral heterogeneity in breast cancer tissues. *PLoS One* 7, e40285.
- Millanta, F., Citi, S., Della Santa, D., Porciani, M., Poli, A., 2006. COX-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. *Breast Cancer Research and Treatment* 98, 115-120.
- Misdorp, W., Else, R.W., Hellmen, E., 1999. *Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat*. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Niikura, N., Liu, J., Hayashi, N., Mittendorf, E.A., Gong, Y., Palla, S.L., Tokuda, Y., Gonzalez-Angulo, A.M., Hortobagyi, G.N., Ueno, N.T., 2012. Loss of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) expression in metastatic sites of HER2-overexpressing primary breast tumors. *Journal of Clinical Oncology* 30, 593-599.
- Owen, L.N., 1980. *TNM Classification of tumors in Domestic Animals*, First Ed. World Health Organization, Geneva, Switzerland, pp. 26–32.
- 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.
- Pereira, P.D., Lopes, C.C., Matos, A.J.F., Santos, M., Gärtner, F., Medeiros, R., Lopes, C., 2009. COX-2 expression in canine normal and neoplastic mammary gland. *Journal of Comparative Pathology* 140, 247-253.

- Queiroga, F.L., Pires, I., Lobo, L., Lopes, C.S., 2010. The role of Cox-2 expression in the prognosis of dogs with malignant mammary tumours. *Research in Veterinary Science* 88, 441-445.
- Rampaul, R.S., Pinder, S.E., Wencyk, P.M., Nicholson, R.I., Blamey, R.W., Robertson, J.F., Ellis, I.O., 2004. Epidermal Growth Factor Receptor Status in Operable Invasive Breast Cancer Is It of Any Prognostic Value? *Clinical Cancer Research* 10, 2578-2578.
- Ressel, L., Puleio, R., Loria, G.R., Vannozzi, I., Millanta, F., Caracappa, S., Poli, A., 2013. HER-2 expression in canine morphologically normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissues and its correlation with the clinical outcome. *Research in Veterinary Science* 94, 299-305.
- Santos, A.A., Lopes, C.C., Ribeiro, J.R., Martins, L.R., Santos, J.C., Amorim, I.F., Gärtner, F., Matos, A.J., 2013. Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. *BMC Veterinary Research* 9, 1.
- Silva, I.L.D., Dias, A.P.M., Bertagnolli, A.C., Cassali, G.D., Ferreira, E., 2014. Analysis of EGFR and HER-2 expressions in ductal carcinomas in situ in canine mammary glands. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 66, 763-768.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., McGuire, W.L., 1987. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235, 177-182.
- Sorlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., Van de Rijn, M., Jeffrey, S.S. et al., 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 10869-10874.
- Soslow, R.A., Dannenberg, A.J., Rush, D., Woerner, B.M., Nasir Khan, K., Masferrer, J., Koki, A.T., 2000. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer* 89, 2637-2645.
- Surh, Y.J., Chun, K.S., Cha, H.H., Han, S.S., Keum, Y.S., Park, K.K., Lee, S.S., 2001. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutation Research* 480-481, 243-268.
- Tsutsui, S., Ohno, S., Murakami, S., Hachitanda, Y., Oda, S., 2002. Prognostic value of epidermal growth factor receptor (EGFR) and its relationship to the estrogen receptor status in 1029 patients with breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 71, 67-75.
- Vogel, C.L., Cobleigh, M.A., Tripathy, D., Gutheil, J.C., Harris, L.N., Fehrenbacher, L., Slamon, D.J., Murphy, M., Novotny, W.F., Burchmore, M. et al., 2002. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 20, 719-726.

- Wolff, A.C., Hammond, M.E.H., Hicks, D.G., Dowsett, M., McShane, L.M., Allison, K.H., Allred, D.C., Bartlett, J.M.S., Bilous, M., Fitzgibbons, P. 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* 31, 3997-4013.
- Xu, R., Perle, M.A., Inghirami, G., Chan, W., Delgado, Y., Feiner, H., 2002. 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. *Modern Pathology* 15, 116-124.
- 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.
- Yajima, R., Fujii, T., Yanagita, Y., Fujisawa, T., Miyamoto, T., Hirakata, T., Tsutsumi, S., Lijima, M., Kuwano, H. 2015. Prognostic value of extracapsular invasion of axillary lymph nodes combined with peritumoral vascular invasion in patients with breast cancer. *Annals of Surgical Oncology* 22, 52-58.

Table 1. Details of immunohistochemical reagents and methods used in the study

Target antigen	Clone	Manufacturer	Dilution	AR method	Retrieval solution (pH)	Incubation time (h)
HER-2	polyclonal	Dako	1:200	Water bath (98 °C)	Citrate (6.0)	16
EGFR	31G7	Zymed	1:50	Enzymatic	Pepsin	16
Cox-2	SP21	Labvision	1:80	Water bath (98 °C)	Citrate (6.0)	16
Ki67	Mib-1	Dako	1:25	Pressurised heating (125°C)	Citrate (6.0)	1
Cytokeratin	AE1AE3	Dako	1:100	Water bath (98 °C)	Citrate (6.0)	1

HER-2: human epithelial grown factor receptor 2; EGFR: epithelial grown factor receptor; Cox-2: cyclooxygenase 2; AR: antigen retrieval

Table 2. Clinical-pathological parameters of the primary mammary carcinomas with lymph node metastasis and without metastasis

	n (%)	Primary mammary carcinomas with lymph node metastasis ^a	Primary mammary carcinomas without metastasis ^b
Age (mean±SD)	79	10.88±2.7	10.51±2.9
Breed			
Crossbreed	21	17 (81)	4 (19)
Pure breeds ^c	58	34 (58.6)	24 (41.4)
Reproductive status*			
Intact	47	27 (57.4)	20 (42.6)
Spayed	21	19 (90.5)	2 (9.5)
Tumor Localization*			
Thoracic	3	3 (100)	0 (0)
Cranial abdominal	12	11 (91.7)	1 (8.3)
Caudal abdominal	25	12 (48)	13 (52)
Inguinal	28	16 (57.1)	12 (42.9)
Multicentric	12	10 (83.3)	2 (16.7)
Histological type*			
Mixed tumour carcinoma	32	11 (34.4)	21 (65.6)
Tubular carcinoma	3	3 (100)	0 (0)
Papillar carcinoma	11	8 (72.7)	3 (27.3)
Solid carcinoma	17	13 (76.5)	4 (23.5)
Micropapillary carcinoma	12	12 (100)	0 (0)
Special types of carcinoma ^d	2	2 (100)	0 (0)
Carcinosarcoma	6	5 (83.3)	1 (16.7)
Histological grade*^e			
I	19	7 (36.8)	12 (63.2)
II	44	29 (65.9)	15 (34.1)
III	19	17 (89.5)	2 (10.5)
Tumor size			
T1 (< 3cm)	25	12 (48)	13 (52)
T2 (> 3 and < 5cm)	23	14 (60.9)	9 (39.1)
T3 (> 5 cm)	31	24 (77.4)	7 (22.6)
Stage (TNM)*^f			
I	13	0 (0)	13 (100)
II	9	0 (0)	9 (100)
III	7	0 (0)	7 (100)
IV	54	54 (100)	0 (0)
Angiolymphatic invasion*			
Present	27	22 (81.5)	5 (18.5)
Absent	55	31 (56.4)	24 (43.6)
Extracapsular extension (ECE)			

Present	22	22 (100)	NA
Absent	32	32 (100)	
<i>Number of lymph nodes with ECE</i>			
1	15	15 (100)	NA
≥2	7	7 (100)	

ECE: extracapsular extension; NA: not applied

* significant difference ($p < 0.05$) in Exact of Fisher or Chi-square test

a Some data were not available or an evaluation was not possible for all 54 primary mammary carcinomas with lymph node metastasis

b Some data were not available for all 29 primary mammary carcinomas without metastasis

c pure breeds included Cocker Spaniel, Dachshund, Pitbull, German Shepherd, Pinsher, Schnauzer, Basset Hound, Bichon Frise, Brazilian Fila, Golden Retriever, Siberian Husky and Yorkshire;

d Special types of carcinoma included rich in lipids carcinoma and pleomorphic lobular carcinoma

e Histological grading based on that of Elston and Ellis, 1998.

f I (T1N0M0), II (T2N0M0), III (T3N0M0) and IV (T1,2,3N1M0)

Table 3. Immunohistochemical data of primary mammary carcinomas without metastasis, primary mammary carcinomas with lymph node metastasis and lymph node metastasis

	Primary mammary carcinomas without metastasis n/total (%) ^a	Primary mammary carcinomas with lymph node metastasis n/total (%) ^b	Lymph nodes metastasis n/total (%) ^c
HER-2^d			
Negative	23/25 (88)	44/48 (91.7)	15/23 (65.2)
Positive	3/25 (12)	4/48 (8.3)*	8/23 (34.8)*
EGFR^e			
Negative	22/26 (84.6)	42/48 (87.5)	22/25 (88)
Positive	4/26 (15.4)	6/48(12.5)	3/25 (12)
Cox-2^f			
Low score	21/23 (91.3)	43/50 (86)	19/24 (79.2)
High score	2/23 (8.7)	7/50 (14)	5/24 (20.8)
Ki67 index			
<24%	15/21 (71.4)	24/48 (50)	9/19 (47.4)
>24%	6/21 (28.6)	24/48 (50)	10/19 (52.6)

* significant difference (p = 0.01) in Exact of Fisher test between primary mammary carcinomas and lymph node metastasis.

a Evaluation of HER-2, EGFR, Cox-2 and Ki67 staining was not possible in all 29 primary mammary carcinomas without metastasis.

b Evaluation of HER-2, EGFR, Cox-2 and Ki67 staining was not possible in all 54 primary mammary carcinomas with lymph node metastasis.

c Evaluation of HER-2, EGFR, Cox-2 and Ki67 staining was not possible in all 25 lymph node metastasis.

d Negative: scores 0, 1+ and 2+/Positive: score 3+

e Negative: scores 0, 1+ and 2+/Positive: score 3+

f Low score: score 0 to 5/ High score: score 6 to 12

Table 4. HER-2, EGFR, Cox-2 and Ki67 index status in primary mammary carcinomas and paired lymph node metastasis

	Lymph node metastasis n (%)*							
	HER-2 ^a		EGFR ^b		Cox-2 ^c		Ki67 index ^d	
	Positive	Negative	Positive	Negative	Low score	High score	<24%	>24%
Mammary carcinomas								
n (%)*								
HER-2^a								
Positive	2 (9.5)	1 (4.8)						
Negative	5 (23.8)	13 (61.9)						
EGFR^b								
Positive			0 (0)	4 (19)				
Negative			3 (14.3)	14 (66.7)				
Cox-2^c								
Low score					14 (70)	2 (10)		
High score					1 (5)	3 (15)		
Ki67 index^d								
<24%							4 (23.5)	1 (5.9)
>24%							4 (23.5)	8 (47.1)

* The evaluation of HER-2, EGFR, Cox-2 and Ki67 status in primary mammary carcinomas and paired lymph node metastasis not was possible in all 25 cases

a K coefficient: 0.250 (95% confidence interval: -0.158 to 0.658)

b K coefficient: -0.195 (95% confidence interval: -0.345 to -0.046)

c K coefficient: 0.571 (95% confidence interval: 0.142 to 1.000)

d K coefficient: 0.397 (95% confidence interval: -0.015 to 0.809)

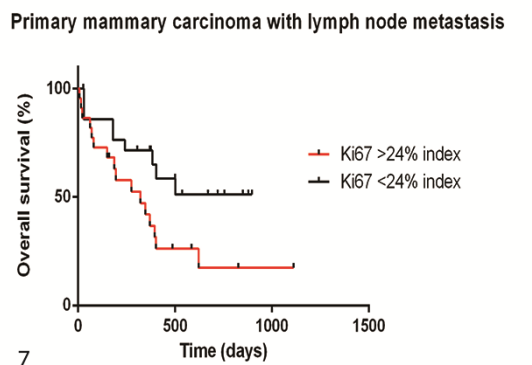
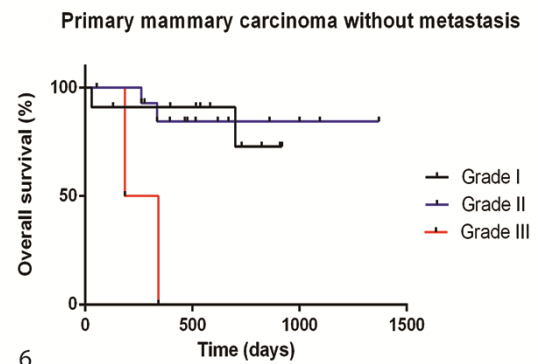
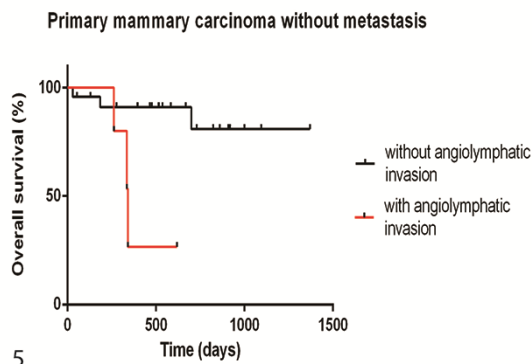
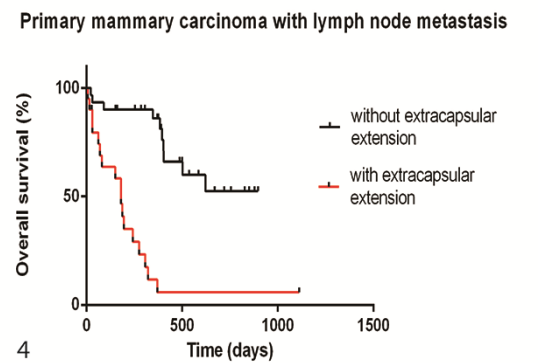
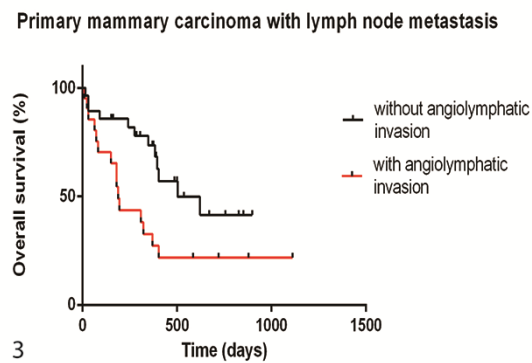
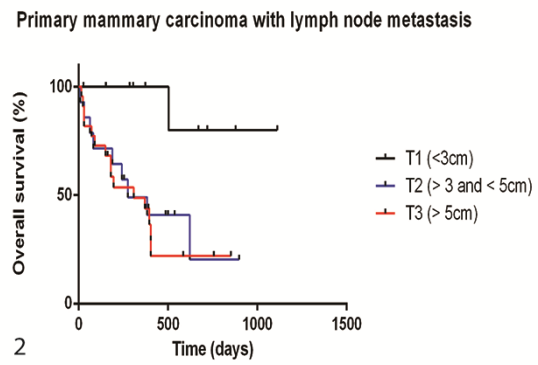
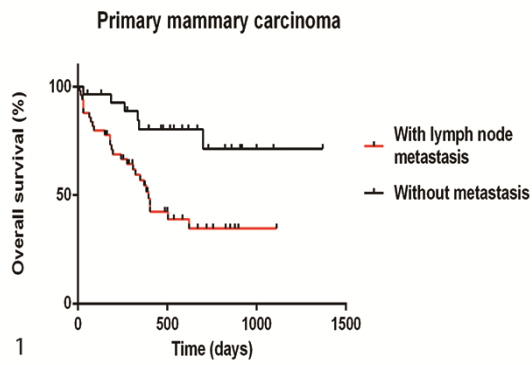


Figure legends

Figure 1. Kaplan-Meier survival curve for the animals with primary mammary carcinoma with lymph node metastasis ($n=50$, median, 395 days) and without metastasis ($n=28$, not reaching median survival) ($P=0.002$). **Figure 2:** Kaplan-Meier survival curve for the animals with primary mammary carcinoma with lymph node metastasis according to size tumor: T1 (<3 cm, $n=11$, not reaching median survival), T2 (> 3 and < 5 cm, $n=14$; median, 275 days) and T3 (>5 cm, $n=22$, median, 308 days) ($P<0.02$). **Figure 3:** Kaplan-Meier survival curve for the animals with primary mammary carcinoma with lymph node metastasis according to angiolymphatic invasion: without angiolymphatic invasion ($n= 28$, median, 503 days) and with angiolymphatic invasion ($n= 21$, median, 188 days) ($P=0.01$). **Figure 4:** Kaplan-Meier survival curve for the animals with primary mammary carcinoma with lymph node metastasis according to extracapsular extension: without extracapsular extension ($n=30$, not reaching median survival) and with extracapsular extension ($n=20$, median, 180 days) ($P<0.0001$). **Figure 5:** Kaplan-Meier survival curve for the animals with primary mammary carcinoma without metastasis according to angiolymphatic invasion: without angiolymphatic invasion ($n= 23$; not reaching median survival) and with angiolymphatic invasion ($n= 5$, median, 341 days) ($P=0.008$). **Figure 6:** Kaplan-Meier survival curve for the animals with primary mammary carcinoma without metastasis according to histologic grade: grade I ($n= 11$, not reaching median survival), grade II ($n= 15$, not reaching median survival) and grade III ($n= 2$, median 263 days) ($P=0.005$). **Figure 7:** Kaplan-Meier survival curve for the animals with primary mammary carcinoma with lymph node metastasis according to the Ki67 index: Ki67 $>24\%$ index ($n=22$, median 322 days) and Ki67 $<24\%$ index ($n=22$, not reaching median survival) ($P=0.03$).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido à alta incidência, importância clínica e a busca por novas terapias alvo para neoplasias mamárias caninas, há um crescente interesse no estudo de biomarcadores prognósticos e preditivos envolvidos na progressão tumoral. Nosso grupo de pesquisa desenvolveu durante os últimos anos vários projetos priorizando o conhecimento e a classificação dos tumores, o estadiamento clínico, a graduação histológica, a padronização de marcadores prognósticos e preditivos, a padronização de critérios para avaliação macroscópica e microscópica dos tumores e também a utilização de tratamento terapêutico com inibidores de Cox. Nesse sentido, a realização de projetos visando estudar as metástases regionais dos carcinomas mamários seria primordial para a nossa linha de pesquisa.

De acordo com os nossos resultados observamos que o número de linfonodos com metástase é um parâmetro prognóstico importante para cadelas com carcinomas mamários e que deveria ser levado em consideração na análise patológica dos linfonodos. Além disso, os animais com macrometástase e com células tumorais isoladas tiveram pior sobrevida. É importante ressaltar, contudo, que uma porcentagem alta de tumores com células tumorais isoladas foram diagnosticados como carcinosarcoma e carcinomas sólidos, tipos histológicos extremamente agressivos. Além disso, a avaliação criteriosa dos linfonodos permitiu observar que animais com metástases > 7,32mm de diâmetro tinham pior sobrevida em relação a aqueles com metástases < 7,32mm. Desse modo, as diferenças de sobrevida nesses animais demonstram que o comportamento das macrometástases pode ser diferente e que o atual sistema de classificação, baseado em humanos, pode não ser o mais adequado para utilização em cães. A adoção de sistemas de classificação diferentes do que são usados em humanos e adaptados para a medicina veterinária já foi debatido por outros autores. Pelo fato das macrometástases atingirem dimensões consideráveis em cadelas, um sistema de subclassificação dessas macrometástases deveria ser discutido.

Outro objetivo importante do nosso trabalho foi avaliar, em linfonodos com metástase, a expressão de marcadores moleculares como o HER-2, EGFR, Cox-2 e Ki67 bem estudados em tumores primários mamários de humanos e caninos. Nossa hipótese era que a frequência de positividade ou alta expressão desses marcadores seria maior nas metástases em relação aos tumores primários. Porém isso somente foi observado para o HER-2. É sabido que o fenótipo epitelial é necessário para a formação dos tumores secundários e sendo esse

marcador expresso principalmente em células epiteliais de vários tumores sólidos, poderíamos sugerir o possível papel da superexpressão dessa molécula no mecanismo associado a implantação das células epiteliais neoplásicas no linfonodo, como o fenômeno de transição mesenquimal-epitelial. Aliado a isso, não observamos nenhuma relação da expressão dessas moléculas nos linfonodos com metástase com a sobrevida dos animais. Esses resultados devem ser confirmados em futuros estudos, porém, nossos achados sugerem inicialmente que a avaliação da expressão desses marcadores nas lesões metastáticas de cães com neoplasias mamárias não levaria a nenhum benefício na conduta clínica a ser tomada junto a esse paciente.

Uma contribuição significativa do trabalho é a relevância prognóstica da identificação de extensão extracapsular em linfonodos com metástase. Essa lesão é de fácil diagnóstico e também sugerimos sua inclusão na análise patológica desses linfonodos, o que poderia auxiliar na escolha da conduta clínica a ser tomada junto ao cão. Porém, o número de linfonodos com extensão extracapsular não foi importante para avaliação prognóstica desses animais, e esse achado deve ser confirmado com mais estudos.

Uma das limitações do trabalho está relacionada ao tratamento quimioterápico heterogêneo realizado em aproximadamente 38% dos animais. Não foi possível realizar as análises em separado do grupo dos animais tratados somente com cirurgia em relação àqueles tratados com quimioterapia adjuvante.

Em medicina humana, os trabalhos relacionados às metástases do câncer de mama, com relação à quantificação da carga metastática, ao tamanho das metástases, ao número de linfonodos e a expressão de marcadores moleculares são mais numerosos e consistentes. Já em medicina veterinária, esses estudos são incipientes e os resultados encontrados no presente trabalho poderão contribuir de forma significativa para futuras propostas de estudos nessa área.

8. CONCLUSÕES GERAIS

I. A presença de metástase é um fator prognóstico negativo em cadelas com carcinomas mamários.

II. Nesse estudo, a presença de macrometástases ou de células tumorais isoladas em linfonodos de cadelas com carcinomas mamários estão associadas a pior prognóstico.

III. Mais de 1 (um) linfonodo positivo para metástase bem como linfonodos com área de metástase $>20.11 \text{ mm}^2$ e com diâmetro metastático $>7.32 \text{ mm}$ estão associados com menores tempos de sobrevida. O número de focos metastáticos e a área metastática total não são parâmetros prognósticos relevantes em cadelas com carcinomas mamários.

IV. A presença de extensão extracapsular em linfonodos com metástase é um fator prognóstico significativo, porém a avaliação do número de linfonodos com extensão extracapsular foi indiferente para avaliação prognóstica dos animais.

V. O tamanho médio dos carcinomas mamários com metástase linfonodal foi maior que aqueles sem metástase, mostrando ser um parâmetro prognóstico significativo em cadelas com carcinomas mamários com metástase linfonodal.

Os carcinomas em tumores mistos foram mais frequentes nos animais sem metástase sendo os tumores não mistos e os carcinosarcomas mais frequentes em animais com metástase linfonodal. Os animais com carcinoma sólido, carcinosarcoma e os incluídos na categoria de raros tipos de tumores mamários malignos tiveram pior sobrevida quando comparado aos animais com carcinomas em tumores mistos e carcinomas papilares e tubulares.

O grau histológico I foi mais frequente nos carcinomas mamários sem metástase, enquanto que os graus II e III em carcinomas mamários com metástase linfonodal. A relevância prognóstica do grau histológico foi demonstrada apenas nos carcinomas mamários sem metástase, apesar de haver uma correlação negativa entre o grau histológico dos carcinomas mamários com metástase linfonodal e sobrevida.

Invasão angiolinfática foi mais frequente nos carcinomas mamários com metástase linfonodal sendo considerado um parâmetro prognóstico relevante tanto nos animais apresentando carcinomas mamários com metástase linfonodal e também naqueles sem metástase.

Nos carcinomas mamários com metástase linfonodal foi observada correlação positiva entre invasão angiolinfática, com grau histológico, com presença de extensão extracapsular e com número de linfonodos com extensão extracapsular. Nos carcinomas mamários sem metástase foi observada correlação positiva entre grau histológico com tamanho tumoral e com invasão angiolinfática. Além disso, nesses tumores invasão angiolinfática estava positivamente correlacionada com tamanho tumoral.

VI. Não houve diferenças nas frequências de expressão dos marcadores moleculares estudados nos carcinomas mamários com e sem metástase linfonodal. Contudo, alto índice de proliferação celular estava relacionado com pior sobrevida em animais com carcinomas mamários com metástase. Observamos uma maior frequência de positividade para Her-2 nos linfonodos com metástase em relação aos carcinomas primários. Porém, não foram observadas diferenças na frequência de expressão entre os linfonodos com metástase e os tumores primários em relação aos outros marcadores estudados. A avaliação da expressão dos marcadores Her-2, Egfr, Cox-2 e Ki67 nas metástases linfonodais não mostrou ser um parâmetro prognóstico significativo em cadelas com carcinomas mamários. Além disso, na análise do coeficiente de Kappa foi observada concordância na expressão de Her-2, Cox-2 e Ki67 e discordância na expressão de Egfr entre carcinomas primários e suas respectivas metástases linfonodais.

VII. Nos carcinomas mamários com metástase linfonodal, um alto índice de proliferação celular estava correlacionado com presença de extensão extracapsular e com um maior número de linfonodos com extensão extracapsular.

Em carcinomas mamários sem metástase, alto grau histológico estava correlacionado com positividade para Her-2 e com um alto índice de proliferação celular. Além disso, positividade para Egfr nos tumores sem metástase estava correlacionada com presença de invasão angiolinfática e elevado tamanho tumoral.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, S. S.; THIKE, A. A.; IQBAL, J. et al. Sentinel lymph nodes with isolated tumour cells and micrometastases in breast cancer: clinical relevance and prognostic significance. *J. Clin. Pathol.*, v.67, n.3, p.243-250, 2014.

ALLRED, D. C.; CLARK, G. M.; MOLINA, R. et al. Overexpression of HER-2/neu and its relationship with other prognostic factors change during the progression of in situ to invasive breast cancer. *Hum. Pathol.*, v.23, n.9, p.974-979, 1992.

ARGYLE, D.J.; KHANNA, C. Tumor biology and metastasis. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN'S, E. G. Small clinical veterinary oncology. 5th ed. St Louis, US: Saunders Elsevier, 2013. p. 30-50.

AZIZ, S. A.; PERVEZ, S.; KAYANI, N. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) as a prognostic marker: an immunohistochemical study on 315 consecutive breast carcinoma patients. *J. Pak. Med. Assoc.*, v.52, n.3, p.104-110, 2002.

BACUS, S. S.; ZELNICK, C. R.; PLOWMAN, G.; YARDEN, Y. Expression of the erbB-2 family of growth factor receptors and their ligands in breast cancers. Implication for tumor biology and clinical behavior. *Am. J. Clin. Pathol.*, v.102, p.S13-24, 1994.

BARGMANN, C. I.; HUNG, M. C.; WEINBERG, R. A. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature.*, v.319, p.226-230, 1986.

BEHA, G.; BRUNETTI, B.; ASPRONI P. 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.*, v.8, 2012. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/8/219>

BERTAGNOLLI, A. C.; FERREIRA, E.; DIAS, E. J.; CASSALI GD. Canine mammary mixed tumours: immunohistochemical expressions of EGFR and HER-2. *Aus. Vet. J.*, v.89, n.8, p.312-317, 2011.

BHARGAVA, R.; GERALD, W. L.; LI, A. R. et al. EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations. *Mod. Pathol.*, v.18, n.8, p.1027-1033, 2005.

BOSTOCK, D. E. Canine and feline mammary neoplasms. *Br. Vet. J.*, v.142, n.6, p.506-515, 1986.

BOUZUBAR, N.; WALKER, K. J.; GRIFFITHS, K. et al. Ki67 immunostaining in primary breast cancer: pathological and clinical associations. *Br. J. Cancer.*, v. 59, n.6, p.943-947, 1989.

BRASILEIRO-FILHO, G.; PEREIRA, F. E. L.; GUIMARÃES, R. C. Alterações da proliferação e da diferenciação celulares. In: Bogliolo Patologia Geral. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p. 233-283.

- BRUNETTI, B.; SARLI, G.; PREZIOSI, R. et al. E-cadherin Expression in Canine Mammary Carcinomas with Regional Lymph Node Metastases. *J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.*, v.50, n.10, p.496-500, 2003.
- BUTLER, L. M.; BONNETT, B. M.; PAGE, R. L. Epidemiology and the Evidence Based Medicine Approach. In: WITHROW, S. J; MACEWEN'S, E. G. *Small clinical veterinary oncology*. 5th ed. St Louis, US: Saunders Elsevier, 2013. p. 68-82.
- CARVALHO, M. I.; GUIMARÃES, M. J, PIRES, I. et al. EGFR and microvessel density in canine malignant mammary tumours. *Res Vet Sci.*, v.95, n.3, p.1094-1099. 2013.
- CASSALI, G. D.; GARTNER, F.; VIEIRA DA SILVA, M. J.; SCHMITT, F. C. Cytological diagnosis of a metastatic canine mammary tumor in pleural effusion. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.51, n.4, p.307-310, 1999.
- CASSALI, G. D.; SERAKIDES, R.; GARTNER, F.; SCHMITT, F. C. Invasive micropapillary carcinoma of the dog mammary gland. A case report. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.54, n.4, p.366-369, 2002.
- CASSALI, G. D.; LAVALLE, G. E.; DE NARDI, A. B. et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. *Braz. J. Vet. Pathol.*, v.4, n.2, p.153-180, 2011.
- CASSALI, G.; BERTAGNOLLI, A.; FERREIRA, E. et al. (2012). Canine mammary mixed tumours: a review. *Vet. Med. Intern.*, 2012.
- CASSALI, G. D.; LAVALLE, G. E.; FERREIRA, E. et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors - 2013. *Braz. J. Vet. Pathol.*, v.7, n.2, p.38-69, 2014.
- CAVALCANTI, M. F. Fatores prognósticos na abordagem clínica e histopatológica dos carcinomas mamários de cadelas: estadiamento TNM e sistema de Nottingham. 2006. 106 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- CHAE, A. W.; VANDEWALKER, K. M.; LI, Y. J. et al. Quantitation of sentinel node metastatic burden and Her-2/neu over-expression accurately predicts residual axillary nodal involvement and extranodal disease in breast cancer. *Eur. J. Surg. Oncol.*, v.39, n.6, p.627-633, 2013.
- 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.*, v.227, n.10, p.1625-1629, 2005.
- CHO, E. Y.; HAN, J. J.; CHOI, Y. L. et al. Comparison of Her-2, EGFR and cyclin D1 in primary breast cancer and paired metastatic lymph nodes: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *J. Korean. Med. Sci.*, v.23, v.6, p.1053-1061, 2008.
- CIARDIELLO, F.; TORTORA, G. Epidermal growth factor receptor (EGFR) as a target in cancer therapy: understanding the role of receptor expression and other molecular

determinants that could influence the response to anti-EGFR drugs. *Eur. J. Cancer.*, v.39, n.10, p.1348-1354, 2003.

COATES, A. S.; WINER, E. P.; GOLDBIRSCHE, A. et al. Tailoring therapies-improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. *Ann. Oncol.*, 2015.

COTE, R.; PETERSON, H.; CHAIWUN, B. et al. Role of immunohistochemical detection of lymph-node metastases in management of breast cancer. *Lancet.*, v.354, n.9182, p.896-900, 1999.

CSERNI, G.; AMENDOEIRA, I.; APOSTOLIKAS, N. et al. Pathological work-up of sentinel lymph nodes in breast cancer. Review of current data to be considered for the formulation of guidelines. *Eur. J. Cancer.*, v.39, n.12, p.1654-1667, 2003.

CSERNI, G.; BIANCHI, S.; VEZZOSI, V. et al. Variations in sentinel node isolated tumour cells/micrometastases and non-sentinel node involvement rates according to different interpretations of the TNM definitions. *Eur. J. Cancer.*, v.44, n.15, p.2185-2191, 2008.

DE LAS MULAS, J. M.; ORDÁS, J.; MILLÁN, Y. et al. Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas. *Breast. Cancer. Res. Treat.*, v.80, n.3, p.363-367, 2003.

DE MATOS, A. J.; FAUSTINO, A. M.; LOPES, C. C. et al. Detection of lymph node micrometastases in malignant mammary tumours in dogs by cytokeratin immunostaining. *Vet. Rec.*, v.158, n.18, p.626-630, 2006.

DE MATOS, A. J.; LOPES, C. C.; FAUSTINO, A. M. et al. E-cadherin, β -catenin, invasion and lymph node metastases in canine malignant mammary tumours. *APMIS.*, v.115, n.4, p.327-334, 2007.

DENKERT, C.; WINZER, K. J.; MÜLLER, B. M. et al. Elevated expression of cyclooxygenase-2 is a negative prognostic factor for disease free survival and overall survival in patients with breast carcinoma. *Cancer.*, v.97, n.12, p. 2978-2987, 2003.

DONEGAN, W. L.; STINE, S. B.; SAMTER, T. G. Implications of extracapsular nodal metastases for treatment and prognosis of breast cancer. *Cancer.*, v.72, n.3, p.778-782, 1993.

DONNAY, I.; DEVLEESCHOUWER, N.; WOUTERS-BALLMAN, P. et al. Relationship between receptors for epidermal growth factor and steroid hormones in normal, dysplastic and neoplastic canine mammary tissues. *Res Vet Sci.*, v.60, n.3, p.251-254, 1996.

DORÉ, M.; LANTHIER, I.; SIROIS, J. Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors. *Vet Pathol.*, v.40, n.2, p. 207-212, 2003.

DOWNWARD, J.; YARDEN, Y.; MAYES, E. et al. Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature.*, v.307, n.9, p.521-527, 1984.

DUTRA, A. P.; AZEVEDO JÚNIOR, G. M.; SCHMITT, F. C.; CASSALI, G. D. Assessment of cell proliferation and prognostic factors in canine mammary gland tumors. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.60, n.6, p.1403-1412, 2008.

DUTRA, A. P.; GRANJA, N. V. M.; SCHMITT, F. C.; CASSALI, G. D. c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.37, n.11, p.1673-1681, 2004.

ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Assessment of histological grade. In: *The Breast*, 3th ed. London, UK: Churchill Livingstone, 1998. p. 365-384.

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.

ESTRELA-LIMA, A.; ARAÚJO, M. S.; COSTA-NETO, J. M. et al. Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. *BMC Cancer.*, v.10, n.1, 2010. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/10/256>

FERREIRA, E.; GOBBI, H.; SARAIVA, B. S.; CASSALI, G. D. Histological and immunohistochemical identification of atypical ductal mammary hyperplasia as a preneoplastic marker in dogs. *Vet. Pathol.*, v.49, n.2, p.322-329, 2012.

FERRERO, J. M.; RAMAIOLI, A.; LARGILLIER, R. et al. Epidermal growth factor receptor expression in 780 breast cancer patients: a reappraisal of the prognostic value based on an eight-year median follow-up. *Ann. Oncol.*, v.12, n.6, p.841-846, 2001.

FISHER, B.; GEBHARDT, M. C. The evolution of breast cancer surgery: past, present, and future. *Semin. Oncol.*, v.5, n.4, p.385-394, 1978.

FISHER, E. R.; PALEKAR, A.; ROCKETTE, H. et al. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (Protocol No. 4). V. Significance of axillary nodal micro and macrometastases. *Cancer.*, v.42, n.4, p.2032-2038, 1978.

FISHER, C. S.; COLE, D. J.; MITAS, M. et al. Molecular detection of micrometastatic breast cancer in histopathology-negative axillary lymph nodes fails to predict breast cancer recurrence: a final analysis of a prospective multi-institutional cohort study. *Ann. Surg. Oncol.*, v.17, suppl 3, p. 312-320, 2010.

FITZGIBBONS, P. L.; PAGE, D. L.; WEAVER, D.; THOR, A. D. Prognostic factors in breast cancer: College of American Pathologists consensus statement 1999. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, v.124, n.7, p.966-978, 2000.

FUJII, T.; YANAGITA, Y.; FUJISAWA, T. et al. Implication of extracapsular invasion of sentinel lymph nodes in breast cancer: prediction of nonsentinel lymph node metastasis. *World. J. Surg.*, v.34, n.3, p.544-548, 2010.

GAMA, A.; ALVES, A.; SCHMITT, F. C. Clinicopathologic features of mammary invasive micropapillary carcinoma (IMC) in dogs. *Vet. Pathol.*, v.45, n.4, p.600-601, 2008.

GAMA, A.; GÄRTNER, F.; ALVES, A.; SCHMITT, F. Immunohistochemical expression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) in canine mammary tissues. *Res. Vet. Sci.*, v.87, n.3, p.432-437, 2009.

GAMBA, C. O.; DIAS, E. J.; RIBEIRO, L. G. et al. Histopathological and immunohistochemical assessment of invasive micropapillary mammary carcinoma in dogs: a retrospective study. *Vet. J.*, v.196, n.2, p.241-246, 2013.

GILBERTSON, S. R.; KURZMAN, I. D.; ZACHRAU, R. E. et al. Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Vet. Pathol.*, v.20, n.2, p.127-142, 1983.

GOLDHIRSCH, A.; WOOD, W. C.; COATES, A. S. et al. 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.*, v.22, n.8, p.1736-1747, 2011.

GOLDSCHMIDT, M.; PEÑA, L.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V. Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet. Pathol.*, v.48, n.1, p.117-131, 2011.

GONG, Y.; BOOSER, D. J.; SNEIGE, N. Comparison of HER-2 status determined by fluorescence in situ hybridization in primary and metastatic breast carcinoma. *Cancer.*, v. 103, n. 9, p.1763-1769, 2005.

GREENE, F. L.; PAGE, D. L.; FLEMING, I. D. et al. Breast. In: GREENE, F. L.; PAGE, D. L.; FLEMING, I. D. et al. *AJCC Cancer Staging Manual*. 6th ed. Springer: New York, 2002. p.223-240.

GRÖSCH, S.; MAIER, T. J.; SCHIFFMANN, S. et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. *J. Natl. Cancer Inst.*, v.98, n.11, p.736-747, 2006.

GUIMARÃES, M. J.; CARVALHO, M. I.; PIRES, I. et al. Concurrent expression of cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor in canine malignant mammary tumours. *J. Comp. Pathol.*, v.150, n.1, p.27-34, 2014.

GUJAM, F. J.; GOING, J. J.; EDWARDS, J. et al. The role of lymphatic and blood vessel invasion in predicting survival and methods of detection in patients with primary operable breast cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, v.89, n.2, p.231-241, 2014.

GUTIERREZ, C.; SCHIFF, R. HER2: biology, detection, and clinical implications. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, v.135, n.1, p.55-62, 2011.

HANNA, W.; NOFECH-MOZES, S.; KAHN, H. J. Intratumoral heterogeneity of HER2/neu in breast cancer – a rare event. *Breast. J.*, v.13, n.2, p.122-129, 2007.

HELLER, D. A.; CLIFFORD, C. A.; GOLDSCHMIDT, M. H. et al. Cyclooxygenase-2 expression is associated with histologic tumor type in canine mammary carcinoma. *Vet. Pathol.*, v.42, n.6, p.776-80, 2005.

HELLMÉN, E.; BERGSTRÖM, R.; HOLMBERG, L. et al. Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. *Vet. Pathol.*, v.30, n.1, p.20-27, 1993.

HETELEKIDIS, S.; SCHNITT, S. J.; SILVER, B. et al. The significance of extracapsular extension of axillary lymph node metastases in early-stage breast cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, v.46, n.1, p. 31-34, 2000.

HSU, W. L.; HUANG, H. M.; LIAO, J. W. et al. 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.*, v.180, n.1, p.116-123, 2009.

IMOTO, S.; OCHIAI, A.; OKUMURA, C. et al. Impact of isolated tumor cells in sentinel lymph nodes detected by immunohistochemical staining. *Eur. J. Surg. Oncol.*, v.32, n.10, p.1175-1179, 2006.

JENSEN, J. D.; KNOOP, A.; EWERTZ, M.; LAENKHOLM, A. V. ER, HER2, and TOP2A expression in primary tumor, synchronous axillary nodes, and asynchronous metastases in breast cancer. *Breast. Cancer. Res. Treat.*, v.132, n.2, p.511-521, 2012.

KARAYANNOPOULOU, M.; KALDRYMIDOU, E.; CONSTANTINIDIS, T. C.; DESSIRIS, A. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. *J. Comp. Pathol.*, v.133, n.4, p. 246-252, 2005.

KIM, N. H.; LIM, H. Y.; IM, K. S. et al Identification of triple-negative and basal-like canine mammary carcinomas using four basal markers. *J. Comp. Pathol.*, v.148, n.4, p. 298-306, 2013.

KLIJN, J. G.; LOOK, M. P.; PORTENGEN, H. et al. The prognostic value of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in primary breast cancer: results of a 10 year follow-up study. *Breast. Cancer. Res. Treat.*, v.29, n.1, p.73-83, 1994.

KLOPFLEISCH, R.; VON EULER, H.; SARLI, G. et al. Molecular carcinogenesis of canine mammary tumors news from an old disease. *Vet. Pathol.*, v.48, n.1, p.98-116, 2011.

KURZMAN, I. D.; GILBERTSON, S. R. Prognostic factors in canine mammary tumors. *Semin. Vet. Med. Surg (Small Anim).*, v.1, n.1, p.25-32, 1986.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.*, v.33, n.1, p.159-174, 1977.

LANGER, I.; MARTI, W. R.; GULLER, U. et al. Axillary recurrence rate in breast cancer patients with negative sentinel lymph node (SLN) or SLN micrometastases. *Ann. Surg.*, v.241, n.1, p.152-158, 2005.

LAVALLE, G. E.; BERTAGNOLLI, A. C.; TAVARES, W. L. F.; CASSALI, G. D. COX-2 expression in canine mammary carcinomas correlation with angiogenesis and overall survival. *Vet. Pathol.*, v.46, n.6, p.1275-1280, 2009.

LEE, C. H.; LIM, J. H.; KIM, D. Y. Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. *J. Vet. Sci.*, v.5, n.1, p.63-69, 2004.

LEONARD, C.; CORKILL, M.; TOMPKIN, J. et al. Are axillary recurrence and overall survival affected by axillary extranodal tumor extension in breast cancer? Implications for radiation therapy. *J. Clin. Oncol.*, 1995; 13(1): 47-53.

LEONARDI, E.; GIRLANDO, S.; SERIO, G. et al. PCNA and Ki67 expression in breast carcinoma: correlations with clinical and biological variables. *J. Clin. Pathol.*, v.45, n.5, p.416-419, 1992.

LÖHR, C. V.; TEIFKE, J. P.; FAILING, K.; WEISS, E. Characterization of the proliferation state in canine mammary tumors by the standardized AgNOR method with postfixation and immunohistologic detection of Ki-67 and PCNA. *Vet. Pathol.*, v.34, n.3, p.212-221, 1997.

MACEWEN, E. G. Spontaneous tumors in dogs and cats: models for the study of cancer biology and treatment. *Cancer. Metastasis. Rev.*, v.9, n.2, p.125-136, 1990.

MALINOWSKY, K.; RAYCHAUDHURI, M.; BUCHNER, T. et al. Common protein biomarkers assessed by reverse phase protein arrays show considerable intratumoral heterogeneity in breast cancer tissues. *PloS one*, v.7, n.7, 2012

MARINHO, V. F. Z.; ZAGURY, M. S.; CALDEIRA, L. G. et al. Micrometastasis in axillary lymph node in breast cancer: immunohistochemistry versus hematoxylin and eosin detection. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, v.40, n.2, p. 127-132, 2004.

MASOOD, S.; BUI, M. M. Assessment of Her-2/neu overexpression in primary breast cancers and their metastatic lesions: an immunohistochemical study. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, v.30, n.3, p.259-265, 2000.

MATTSSON, J. S.; BERGMAN, B.; GRINBERG, M. et al. Prognostic impact of COX-2 in non-small cell lung cancer: a comprehensive compartment-specific evaluation of tumor and stromal cell expression. *Cancer. Lett.*, v.356, n.2, p.837-845, 2015.

MIES, C.; SCHLESSELMAN, J. J. Detection of "occult" lymph node metastasis in breast cancer: should pathologists go the extra mile? *Adv. Anat. Pathol.*, v.7, n.3, p.149-152, 2000.

MILLANTA, F.; CITI, S.; DELLA SANTA, D. et al. COX-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic of molecular markers. *Breast. Cancer. Res. Treat.*, v.98, n.1, p.115-120, 2006.

MILLANTA, F.; ASPRONI, P.; CANALE, A. et al. COX-2, mPGES-1 and EP2 receptor immunohistochemical expression in canine and feline malignant mammary tumours. *Vet. Comp. Oncol.*, 2014.

MILLIS, R. R.; SPRINGALL, R.; LEE, A. H. S. et al. Occult axillary lymph node metastases are of no prognostic significance in breast cancer. *Br. J. Cancer.*, v.86, n.3, p. 396-401, 2002.
MISDORP, W.; ELSE, R. W.; 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, p.18-27.

MISDORP, W.; COTCHIN, E.; HAMPE, J. F. et al. Canine Malignant Mammary Tumours II. Adenocarcinomas, Solid Carcinomas and Spindle Cell Carcinomas. *Vet Pathol.*, v.9, n.6, p.447-470, 1972.

MUNZONE, E.; BAGNARDI, V.; ROTMENSZ, N. et al. Prognostic relevance of peritumoral vascular invasion in immunohistochemically defined subtypes of node-positive breast cancer. *Breast. Cancer. Res. Treat.*, v.146, n.3, p. 573-582, 2014.

MURUA, E.; BECKER, H.; BULLERDIEK, J. The canine ERBB2 gene maps to a chromosome region frequently affected by aberrations in tumors of the dog (*Canis familiaris*). *Cytog. Cell. Genet.*, v. 94, n.3-4, p.194-195, 2001.

NAGASHIMA, T.; SAKAKIBARA, M.; NAKANO, S. et al. Sentinel node micrometastases and distant failure in breast cancer patients. *Breast. Cancer.*, v.13, n.2, p.186-191, 2006.

NASSAR, A.; RADHAKRISHNAN, A.; CABRERO, I. A. et al. Intratumoral heterogeneity of immunohistochemical marker expression in breast carcinoma: a tissue microarray-based study. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.*, v.18, n.5, p.433-441, 2010.

NERI, A.; MARRELLI, D.; ROVIELLO, F. et al. Prognostic value of extracapsular extension of axillary lymph node metastases in T1 to T3 breast cancer. *Ann. Surg. Oncol.*, v.12, n.3, p.246-253, 2005.

NERURKAR, V. R.; SESHADRI, R.; MULHERKAR, R. et al. Receptors for epidermal growth factor and estradiol in canine mammary tumors. *Int J Cancer.*, v.40, n.2, p.230-232, 1987.

NIETO, A.; PEÑA, L.; PÉREZ-ALENZA, M. D. et al. Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Vet Pathol.*, v. 37, n.3, p.239-247, 2000.

NIKURA, N.; LIU, J.; HAYASHI N. et al. Loss of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) expression in metastatic sites of HER2-overexpressing primary breast tumors. *J. Clin. Oncol.*, v.30, n.6, p.593-599, 2012.

NORMANNO, N.; DE LUCA, A.; BIANCO, C. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene.*, v.366, n.1, p.2-16, 2006.

NUNES, F. C.; GAMBA, C. O.; DAMASCENO, K. A 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). In: Abstracts of the II Encontro de Patologia Mamaria Diagnostico, Prognostico e Tratamento das Neoplasias Mamárias da Cadela. *Braz. J. Vet. Pathol.*, v.7, n.2, p.106-143, 2014.

OWEN, L. N. *TNM Classification of tumors in Domestic Animals*. World Health Organization, Geneva. 1 ed. 1980, p. 26-32.

PAGE, D. L.; JENSEN, R. A.; SIMPSON, J. F. Routinely available indicators of prognosis in breast cancer. *Breast. Cancer. Res. Treat.*, v.51, n.3, p.195-208, 1998.

PATANI, N.; MOKBEL, K. Clinical significance of sentinel lymph node isolated tumour cells in breast cancer. *Breast. Cancer. Res. Treat.*, v.127, n.2, p.325-334, 2011.

PATANI, N.; MOKBEL, K. The clinical significance of sentinel lymph node micrometastases in breast cancer. *Breast. Cancer. Res. Treat.*, v.114, n.3, p.393-402, 2009.

PATSIKAS, M. N.; KARAYANNOPOULOU, M.; KALDRYMIDOY, E. et al. The lymph drainage of the neoplastic mammary glands in the bitch: A lymphographic study. *Anat. Histol. Embryol.*, v.35, n.4, p.228-234, 2006.

PENA, L. L.; NIETO, A. I.; PÉREZ-ALENZA, D. et al. Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.10, n.3, p.237-246, 1998.

PEREIRA, P. D.; LOPES, C. C.; MATOS, A. J. F, et al. COX-2 expression in canine normal and neoplastic mammary gland. *J. Comp. Pathol.*, v.140, n.4, p.247-253, 2009.

PEREIRA, C. T.; RAHAL, S. C.; CARVALHO BALIEIRO, J. C.; RIBEIRO, A. A. C. M. Lymphatic drainage on healthy and neoplastic mammary glands in female dogs: can it really be altered? *Anat. Histol. Embryol.*, v.32, p.5, p.282-290, 2003.

PÉREZ ALENZA, M. D.; PEÑA, L.; NIETO, A. I.; CASTAÑO, M. Clinical and pathological prognostic factors in canine mammary tumors. *Ann. Ist. Super. Sanita.*, v.33, n.4, p.581-585, 1997.

PEREZ ALENZA, M. D.; PEÑA, L.; DEL CASTILLO, N.; NIETO, A. I. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *J Small Anim Pract.*, v.41, n.7, p.287-291, 2000.

PIERCE, L. J.; OBERMAN, H. A.; STRAWDERMAN, M. H.; LICHTER, A. S. Microscopic extracapsular extension in the axilla: is this an indication for axillary radiotherapy? *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, v.33, n.2, p.253-259, 1995.

PINDER, S. E.; ELLIS, I. O.; GALEA, M. et al. Pathological prognostic factors in breast cancer. III. Vascular invasion: relationship with recurrence and survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology.*, v.24, n.1, p.41-47, 1994.

QUEIROGA, F. L.; PIRES, I.; LOBO, L.; LOPES, C. S. The role of Cox-2 expression in the prognosis of dogs with malignant mammary tumours. *Res. Vet. Sci.*, v.88, n.3, p.441-445, 2010.

RAMPAUL, R. S.; PINDER, S. E.; WENCYK, P. M. et al. Epidermal Growth Factor Receptor Status in Operable Invasive Breast Cancer Is It of Any Prognostic Value? *Clin Cancer Res.*, v.10, n.7, p.2578-2578, 2004.

RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V.; CASTAGNARO, M.; GOLDSCHMIDT, M. H. A retrospective study of those histopathologic parameters predictive of invasion of the lymphatic system by canine mammary carcinomas. *Vet Pathol.*, v.49, n.2, p.330-340, 2012.

- RESSEL, L.; PULEIO, R.; LORIA, G. R. et al. HER-2 expression in canine morphologically normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissues and its correlation with the clinical outcome. *Res Vet Sci.*, v.94, n.2, p.299-305, 2013.
- ROELOFS, H. M.; TE MORSCHE, R. H.; VAN HEUMEN, B. W, et al. Over-expression of COX-2 mRNA in colorectal cancer. *BMC Gastroenterol.*, 2014.
- RUNGSIPAT, A.; TATEYAMA, S.; YAMAGUCHI, R. et al. Immunohistochemical analysis of c-yes and c-erbB-2 oncogene products and p53 tumor suppressor protein in canine mammary tumors. *J Vet Med Sci.*, v. 61, n.1, p.27-32,1999.
- RUTTEMAN, G. R.; FOEKENS, J. A.; PORTENGEN, H. et al. Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in non-affected and tumorous mammary tissue of female dogs. *Breast Cancer Res Treat.*, v.30, n.2, p.139-146,1994.
- SANTINELLI, A.; PISA, E.; STRAMAZZOTTI, D.; FABRIS, G. HER-2 status discrepancy between primary breast cancer and metastatic sites. Impact on target therapy. *Int. J. Cancer.*, v.122, n.5, p. 999-1004, 2008.
- SANTOS, A. A.; LOPES, C. C.; RIBEIRO, J. R. et al. Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. *BMC. Vet. Res.*, v. 9, 2013. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/9/1>
- SARLI, G.; PREZIOSI, R.; BENAZZI, C. et al. Prognostic value of histologic stage and proliferative activity in canine malignant mammary tumors. *J Vet Diagn Invest.*, v.14, n.1, p.25-34, 2002.
- SILVA, I. L. D.; DIAS, A. P. M.; BERTAGNOLLI, A. C. et al. Analysis of EGFR and HER-2 expressions in ductal carcinomas in situ in canine mammary glands. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.66, n.3, p.763-768, 2014.
- SLAMON, D. J.; CLARK, G.M.; WONG, S. G. et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science.*, v.235, n.4785, p.177-182,1987.
- SLEECKX, N.; DE ROOSTER, H.; VELDHUIS KROEZE, E. J. B. et al. Canine mammary tumours, an overview. *Reprod. Domest. Anim.*, v.46, n.6, p.1112-1131, 2011.
- SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. *Vet. Clin. Small. Anim.*, v. 33, n.3, p. 573-596, 2003.
- 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.
- SORENMO, K. U.; KRISTIENSEN, V. M.; COFONE, M. A. et al. Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Vet. Comp. Oncol.*, v.7, n.3, p.162-172, 2009.

SOSLOW, R. A.; DANNENBERG, A. J.; RUSH, D. et al. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer.*, v.89, n.12, p.2637-2645, 2000.

SURH, Y. J.; CHUN, K. S.; CHA, H. H. et al. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mut. Res.*, v.480-481, 243-268, 2001.

SZCZUBIAL, M.; LOPUSZYNSKI, W. Prognostic value of regional lymph node status in canine mammary carcinomas. *Vet. Comp. Oncol.*, v.9, n.4, p.296-303, 2011.

TAVASOLY, A.; GOLSHAHI, H.; REZAIIE, A.; FARHADI, M. Classification and grading of canine malignant mammary tumors. *Vet. Res. Forum.*, v.4, n.1, p.25-30, 2013.

TSUTSUI, S.; OHNO, S.; MURAKAMI, S. et al. Prognostic value of epidermal growth factor receptor (EGFR) and its relationship to the estrogen receptor status in 1029 patients with breast cancer. *Breast. Cancer. Res. Treat.*; v.71, n.1, p.67-75, 2002.

VAN DE VIJVER, M. J. Molecular tests as prognostic factors in breast cancer. *Virchows. Archiv.*, v.464, n.3, p.283-291, 2014.

VASCELLARI, M.; GIANTIN, M.; CAPELLO, K. et al. Expression of Ki67, BCL-2, and COX-2 in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors Association With Grading and Prognosis. *Vet Pathol.*, v.50, n.1, p.110-121, 2013.

VIALE, G.; MAIORANO, E.; PRUNERI, G. et al. Predicting the risk for additional axillary metastases in patients with breast carcinoma and positive sentinel lymph node biopsy. *Ann Surg.*, v. 241, n.2, p.319-325, 2005.

VIELH, P.; CHEVILLARD, S.; MOSSERI, V. et al. Ki67 index and S-phase fraction in human breast carcinomas. Comparison and correlations with prognostic factors. *Am. J. Clin. Pathol.*, v.94, n.6, p.681-686, 1990.

VOGEL, C. L.; COBLEIGH, M. A.; TRIPATHY, D. et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, v.20, n.3, p.719-726, 2002.

WILLIAMS, C. S.; MANN, M.; DUBOIS, R. N. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene.*, v.18, n.55, p.7908-7916, 1999.

WINTZER, H. O.; ZIPFEL, I.; SCHULTE-MÖNTING, J. et al. Ki-67 immunostaining in human breast tumors and its relationship to prognosis. *Cancer.*, v.67, n.2, p.421-428, 1991.

WOLFF, A. C.; HAMMOND, M. E. H.; HICKS, D. G. 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.

WU, J. M.; FACKLER, M. J.; HALUSHKA, M. K. et al. Heterogeneity of breast cancer metastases: comparison of therapeutic target expression and promoter methylation between

primary tumors and their multifocal metastases. *Clin. Cancer. Res.*, v.14, n.7, p.1938-1946, 2008.

XU R.; PERLE, M. A.; INGHIRAMI, G. et al. 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.*, v.15, n.2, p.116-124, 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.* v.58, n.11, p.1079-1083, 1996.

YAJIMA, R.; FUJII, T.; YANAGITA, Y. et al. Prognostic value of extracapsular invasion of axillary lymph nodes combined with peritumoral vascular invasion in patients with breast cancer. *Ann. Surg. Oncol.* v. 22, n. 52-58, 2015.

ZACCHETTI, A.; VAN GARDEREN, E.; TESKE, E. et al. Validation of the use of proliferation markers in canine neoplastic and non-neoplastic tissues: comparison of KI-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression versus in vivo bromodeoxyuridine labelling by immunohistochemistry. *APMIS.*, v.111, n.3, p.430-438, 2003.

ZIDAN. J.; DASHKOVSKY, I.; STAYERMAN, C. et al. Comparison of HER-2 overexpression in primary breast cancer and metastatic sites and its effect on biological targeting therapy of metastatic disease. *Br J Cancer.*, v.93, n.5, p.552-556, 2005.

10. ANEXOS

Anexo I. Carta de aprovação do CETEA/UFMG – Agosto 2011



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

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 174/2011**, relativo ao projeto intitulado "**Metástases de carcinomas mamários caninos em linfonodos regionais: abordagem clinicopatológica, imunofenotípica e gênica**", que tem como responsável(is) **Geovanni Dantas Cassali**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **10/ 08/2011**.

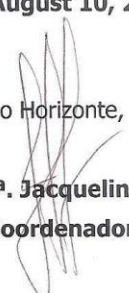
Este certificado expira-se em **10/ 08/ 2016**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 174/2011**, related to the project entitled "**Canine mammary carcinoma metastasis in regional lymph nodes: approach clinicopathological, immunophenotypic and gene**", under the supervisors of **Geovanni Dantas Cassali**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **August 10, 2011**.

This certificate expires in **August 10, 2016**.

Belo Horizonte, 12 de Agosto de 2011.


Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

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

(Mod.Cert. v1.0)

Anexo II. Produção científica relacionada à tese no período de Agosto de 2011 a Julho de 2015:

Artigo Publicado:

1. **ARAÚJO, M. R.**; CAMPOS, L. C.; FERREIRA, E.; CASSALI, G. D. Quantitation of the Regional Lymph Node Metastatic Burden and Prognosis in Malignant Mammary Tumors of Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine.*, 2015.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo simples)

1. **ARAÚJO, M. R.**; FERRACIOLLI, C. J.; CASSALI, G. D. Metástases de carcinoma mamários caninos em linfonodos regionais: abordagem clinicopatológica, imunofenotípica e gênica. In: III Encontro de Patologia, 2012, Belo Horizonte. III Encontro de Patologia, 2012.

2. **ARAÚJO, M. R.**; FERRACIOLLI, C. J.; CAMPOS, L. C.; CASSALI, G. D. Avaliação de linfonodos em cadelas portadoras de carcinomas mamários: uso de uma solução clareadora de gorduras. In: III Encontro de Patologia, 2012, Belo Horizonte. III Encontro de Patologia, 2012.

2. **ARAÚJO, M. R.**; FERREIRA, E.; CAMPOS, L. C.; CASSALI, G. D. Quantitation of regional node metastatic burden and prognosis in canine malignant mammary tumours In: IV Encontro de Patologia Mamária da UFMG 40 anos, 2014, Belo Horizonte.

Resumos enviados para apresentação em eventos:

1. **ARAÚJO, M. R.**; CAMPOS, L. C.; FERREIRA, E.; CASSALI, G. D. Metástases linfáticas de carcinomas mamários caninos: avaliação do tamanho, do índice de proliferação celular (ki67) e sua relação com prognóstico. In: O 3º CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA VETERINÁRIA - ENPAVE 2015, 2015, Belo Horizonte.

Anexo III - Produção científica não relacionada à tese no período de Agosto de 2011 a Julho de 2015:

Artigos Publicados

1. GAMBA, C. O.; **ARAÚJO, M. R.**; PALHARES, M. S., GARBIN, L. C.; MARANHÃO, R. P. A.; CASSALI, G. D.; ECCO, R. Invasive micropapillary carcinoma of the mammary glands in a mare. *The Veterinary Quarterly*., v.31, p.207 - 210, 2011.
2. PIRES, P. S.; ECCO, R.; **ARAÚJO, M. R.**; SILVA, R. O. S.; SALVARANI, F. M.; HENEINE, L. G. D.; ASSIS, R. A.; LOBATO, F. C. F. Comparative analysis of lesions caused by histotoxic clostridia in experimentally induced myonecrosis. *Semina. Ciências Agrárias (Impresso)*., v.33, p.2337 - 2346, 2012.
3. HORTA, R. S.; VIANA, A. A. S.; QUEIROZ, A. T.; LAVALLE, G. E.; **ARAÚJO, M. R.**; ARAÚJO, R. B. Diagnóstico diferencial entre sarcoma histiocítico e tumor venéreo transmissível com disseminação extragenital - relato de caso. *Clínica Veterinária (São Paulo)*. v.98, p.96 - 102, 2012.
4. **ARAÚJO, M. R.**; PREIS, I. S.; LAVALLE, G. E.; CASSALI, G. D.; ECCO, R. Histomorphological and immunohistochemical characterization of 172 cutaneous round cell tumours in dogs. *Pesquisa Veterinária Brasileira (Impresso)*., v.32, p.772 - 780, 2012.
5. CAMPOS, L. C.; SOUZA, C. M.; SANTOS, F. S.; **ARAÚJO, M. R.**; CASSALI, G. D. Utilização de modelos animais no estudo de marcadores séricos tumorais no câncer de mama. *Ambito Hospitalar*., v.215, p.11 - 16, 2012.
6. COUTO, R. M.; FRANÇA, S. A.; **RIOS, M. A.**; ROSADO, I. R.; COSTA, P. M.; ECCO, R. Clinical and pathological findings of necrotizing meningoencephalitis in a Maltese dog. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*., v.6, p.31 - 36, 2013.
7. GARCIA, C. M. S., **ARAÚJO, M. R.**, LOPES, M.T.P., FERREIRA, M.A.N.D., Geovanni Dantas Cassali. Morphological and Immunophenotypical Characterization of Murine Mammary Carcinoma 4t1. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*. , v.7, p.158 - 165, 2014.
8. **ARAÚJO, M. R.**, DAMASCENO, K.A., GAMBA, C.O., CAMPOS, C.B., CAMPOS, L. C., REIS, D. C., SOUZA, C. M. DE, Geovanni Dantas Cassali. Morphological and immunohistochemical characterization of five phyllodes mammary gland tumors in dogs. *Online Journal of Veterinary Research*. , v.18, p.688 - 695, 2014.
9. CASSALI, G. D.; LAVALLE, G. E.; FERREIRA, E.; ESTRELA-LIMA, A.; DE NARDI, A. B.; GHEVER, C.; SOBRAL, R. A.; AMORIN, R. L.; OLIVEIRA, L. O.; SUEIRO, F. A. R.; BESERRA, H. E. O.; BERTAGNOLLI, A. C.; GAMBA, C. O.; DAMASCENO, K. A.; CAMPOS, C. B.; **ARAÚJO, M. R.**; CAMPOS, L. C.; MONTEIRO, L. D.; NUNES, F. C.; HORTA, R. S.; REIS, D. C.; LUVIZOTTO, M. C. R.; MAGALHÃES, G. M.; RAPOSO, J. B.; FERREIRA, A. M. R.; TANAKA, N. M.; GRANDI, F.; UBUKATA, R.; BATSCINSKI, K.; TERRA, E. M.; SALVADOR, R. C. L.; JARK, P. C.; DELECRODI, J. E. R.; NASCIMENTO, N. A.; SILVA, D. N.; SILVA, L. P.; FERREIRA, K. C. R. S.; FREHSE, M. S.; DI SANTIS, G. W.; SILVA, E. O.; GUIM, T. N.; KERR, B.; CINTRA, P.

P.; SILVA, F. B. F.; LEITE, J. S.; MELLO, M. F. V.; FERREIRA, M. L. G.; FUKUMASU, H.; SALGADO, B. S.; TORRES, R. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors - 2013. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology.* , v.7, p.38 - 69, 2014.

Artigos aceitos

1. CAMPOS, L. C.; SILVA, J. O.; SANTOS, F. S.; **ARAÚJO, M. R.**; LAVALLE, G. E.; FERREIRA, E.; CASSALI, G. D. Prognostic significance of tissue and serum HER2 and MUC1 in canine mammary cancer. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* , 2015.

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. CAMPOS, D. C.; SILVEIRA, M. B.; SANTOS, P. F.; FERREIRA, S. M. Z. M. D.; SOUZA, C. M.; CAMPOS, L. C.; FERREIRA, E.; **ARAÚJO, M. R.**; CASSALI, G. D.; MALAMUT, C.; SILVA, J. B. Single Toxicity and Biodistribution Studies of Fluorocholine In: International Nuclear Atlantic Conference, 2013. **Anais do International Nuclear Atlantic Conference.** , 2013.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo simples)

1. SOUZA, C.M.; DAMASCENO, K. A.; REIS, D.C.; **ARAÚJO, M. R.**; CAMPOS, L. C.; SILVA, A. C. A.; LOPES, M. T. P.; RUSSO, R. C.; FERREIRA, M. A. N. D.; CASSALI, G. D. Avaliação da resposta inflamatória linfocítica no carcinoma mamário murino 4t1 In: XXVIII Congresso Brasileiro de Patologia Latinoamericana, 2011, Maceió. *Jornal Brasileiro de Patologia e medicina laboratorial*, 2011. v.47. p.546 – 546.

2. PIRES, P. S.; ECCO, R.; SILVA, R. O. S.; **ARAÚJO, M. R.**; SALVARANI, F. M.; HENEINE, L. G. D.; TEIXEIRA, A. I. P.; QUEIROZ, L. F.; ASSIS, R. A.; HENEINE, L. G. D.; SANTOS, R. L.; LOBATO, F. C. F. Diagnóstico retrospectivo de agentes causadores de mionecroses, por imuno-histoquímica, no Mato Grosso do Sul, Brasil. In: Encontro Nacional de Defesa Sanitária Animal - Endesa 2011, muitas culturas uma ciência, 2011, São Paulo. *Anais do Encontro Nacional de Defesa Sanitária Animal - Endesa 2011, muitas culturas uma ciência.* São Paulo: Revista O Biológico, 2011. v. 73. p. 48 – 48.

3. **ARAÚJO, M. R.**; PREIS, I. S.; LAVALLE, G. E.; CASSALI, G. D.; ECCO, R. Use of immunohistochemistry in the differential diagnosis of cutaneous round cell tumours in dogs. In: São Paulo Advanced School of Comparative Oncology, 2013, Águas de São Pedro. São Paulo Advanced School of Comparative Oncology: Abstracts, 2012. v. 7. p. 34-35.

4. DIAS, A. P. M.; NUNES, R. A.; LOPES, P. P. C.; **ARAÚJO, M. R.**; CAMPOS, L. C.; FERREIRA, E. Educação inclusiva em Patologia: proposta pedagógica para o aluno portador de deficiência visual In: XXII SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA da UFMG, 2013, Belo Horizonte. **Anais da XXII SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA da UFMG.**, 2013.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. NUNES, F. C.; GAMBA, C. O.; DAMASCENO, K. A.; CAMPOS, C. B., HORTA, R. S.; **ARAÚJO, M. R.**; LAVALLE, G. E.; FERREIRA, E.; CASSALI, G. D. Analysis of clinical-

pathological data, therapeutic conduct and overall survival of canine mammary lesions attend at the Veterinary Hospital of the Federal University of Minas Gerais (UFMG) In: II Encontro de Patologia Mamária Diagnostico, Prognóstico e Tratamento das Neoplasias Mamárias da Cadela, 2013, Belo Horizonte. **Abstracts of the II Encontro de Patologia Mamária Diagnostico, Prognóstico e Tratamento das Neoplasias Mamárias da Cadela.**, 2014. v.7. p.122 – 126.

2. MONTEIRO, L. N.; ARAÚJO, M. R.; REIS, D. CL.; CAMPOS, C. B.; FERREIRA, E.; CASSALI, G. D. Teratoma Maligno Extragonadal em um cão In: XVI Encontro Nacional de Patologia Veterinária e II Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária, 2013, Curitiba. **Resumos do XVI Encontro Nacional de Patologia Veterinária e II Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária.** Archives of Veterinary Science, 2013. v.18. p.719 – 720.

3. GAMBA, C. O.; MONTEIRO, L. N.; NUNES, F. C.; ARAÚJO, M. R.; FERREIRA, E.; CASSALI, G. D. Tumor de Bainha de Nervo Periférico Maligno do plano nasal em um felino: relato de caso In: XVI Encontro Nacional de Patologia Veterinária e II Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária, 2013, Curitiba. **Resumos do XVI Encontro Nacional de Patologia Veterinária e II Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária.** Archives of Veterinary Science, 2013. v.18. p.731 – 733.

4. ARAÚJO, M. R.; DAMASCENO, K. A.; GAMBA, C. O.; REIS, D. C.; FERREIRA, E.; CASSALI, G. D. Tumor Filodes da Glândula Mamária Canina: Relato de cinco casos In: XVI Encontro Nacional de Patologia Veterinária e II Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária, 2013, Curitiba. **Resumos do XVI Encontro Nacional de Patologia Veterinária e II Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária.** Archives of Veterinary Science, 2013. v.18. p.734 – 736

5. CAMPOS, L. C.; SOUZA, C. M.; CAMPOS, C. B., GAMBA, C. O.; DAMASCENO, K. A.; ARAÚJO, M. R.; LAVALLE, G. E.; CASSALI, G. D. Abordagem histomorfológica e imunofenotípica de adenocarcinoma papilar de seio nasal In: XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária e I Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária, 2011, Goiânia. **Anais do XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária e I Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária.**, 2011.

6. ARAÚJO, M. R.; PREIS, I. S.; LAVALLE, G. E.; CASSALI, G. D.; ECCO, R. Diferenciação dos tumores de células redondas em cães pela imuno-histoquímica In: XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária e I Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária, 2011, Goiânia. **Anais do XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária e I Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária.** , 2011.

7. NEVES, S. M. N.; PEREIRA, C. E. R.; BRAGA, J. F. V.; APRIGIO, A. L. D.; TORRES, B. B. J.; MARTINS, B. C.; MARTINS, G. C.; RIOS, M. A. Melanoma com disseminação meníngea e pulmonar associada a osteopatia hipertrófica em cão: relato de caso In: XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária e I Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária, 2011, Goiânia. **Anais do XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária e I Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária.**, 2011.

8. VIMEIRO, T. R.; DAMASCENO, K. A.; ARAÚJO, M. R.; SILVA, J. O.; ORLANDO, D. R.; SEIXAS, J. N.; CASSALI, G. D.; FERREIRA, E. Risco de progressão neoplásica na mama canina: carcinoma ductal in situ surgindo em uma atipia epitelial plana In: XV

Encontro Nacional de Patologia Veterinária e I Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária, 2011, Goiânia. **Anais do XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária e I Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária.** , 2011.

9. AVELAR, I. O.; TINOCO, H. P.; MALTA, M. C. C.; PREIS, I. S.; **ARAÚJO, M. R.**; CASSALI, G. D.; ECCO, R. Timoma misto em um quati (*Nasua nasua*) In: XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária e I Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária, 2011, Goiânia. **Anais do XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária e I Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária.**, 2011.

10. SOUZA, C. R.; VIEIRA, T. S., DAMASCENO, K. A.; GAMBA, C. O.; CAMPOS, L. C.; **ARAÚJO, M. R.**; AULER, P. A. Geovanni Dantas Cassali. Tumor misto de glândula sudorípara canino: relato de caso In: XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária e I Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária, 2011, Goiânia. **Anais do XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária e I Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária.**, 2011.