

CONRADO DE OLIVEIRA GAMBA

**CARCINOMA MICROPAPILAR INVASIVO
DA GLÂNDULA MAMÁRIA CANINA: ANÁLISE CLÍNICO-PATOLÓGICA,
IMUNO-HISTOQUÍMICA E DETERMINAÇÃO DA SOBREVIDA GLOBAL**

**Belo Horizonte
Fevereiro de 2012**



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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CARCINOMA MICROPAPILAR INVASIVO
DA GLÂNDULA MAMÁRIA CANINA: ANÁLISE CLÍNICO-PATOLÓGICA,
IMUNO-HISTOQUÍMICA E DETERMINAÇÃO DA SOBREVIDA GLOBAL

Belo Horizonte

Fevereiro de 2012

CONRADO DE OLIVEIRA GAMBA

**CARCINOMA MICROPAPILAR INVASIVO
DA GLÂNDULA MAMÁRIA CANINA: ANÁLISE CLÍNICO-PATOLÓGICA,
IMUNO-HISTOQUÍMICA E DETERMINAÇÃO DA SOBREVIDA GLOBAL**

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

Área de Concentração: Patologia Geral

Orientador: Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali

Co-orientador: Prof. Dr. Enio Ferreira

Belo Horizonte

Faculdade de Medicina - UFMG

2012

G187c Gamba, Conrado de Oliveira.
Carcinoma micropapilar invasivo da glândula mamária canina [manuscrito]: análise clínico-patológica, imuno-histoquímica e determinação da sobrevida global. / Conrado de Oliveira Gamba. -- Belo Horizonte: 2012.
73f.: il.
Orientador: Geovanni Dantas Cassali.
Co-Orientador: Enio Ferreira.
Área de concentração: Patologia Geral.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Neoplasias Mamárias Animais. 2. Glândulas Mamárias Animais. 3. Imunoistoquímica. 4. Análise de Sobrevida. 5. Cães. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Cassali, Geovanni Dantas. II. Ferreira, Enio. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.
NLM: OZ 200



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409-9640
cpg@medicina.ufmg.br



UFMG

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de **CONRADO DE OLIVEIRA GAMBA**, nº de registro 2010658498. Às quatorze horas do dia **17 de fevereiro de dois mil e doze**, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de defesa de dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **"CARCINOMA MICROPAPILAR INVASIVO DA GLÂNDULA MAMÁRIA CANINA: ANÁLISE CLÍNICO-PATOLÓGICA, IMUNO-HISTOQUÍMICA E DETERMINAÇÃO DA SOBREVIDA GLOBAL"**, requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG - Área de Concentração em Patologia Geral. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Geovanni Dantas Cassali, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final passou a palavra ao candidato para apresentação do seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença do candidato e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Geovanni Dantas Cassali/Orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADO</u>
Prof. Ênio Ferreira/Coorientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADO</u>
Prof. Victor Piana de Andrade	Instituição: H.AC Camargo	Indicação: <u>APROVADO</u>
Prof. Vanessa Fortes Zschaber Marinho	Instituição: UFMG	Indicação: <u>aprovado</u>

Pelas indicações, o candidato foi considerado APROVADO.

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 17 de fevereiro de 2012.

Prof. Geovanni Dantas Cassali _____

Prof. Ênio Ferreira _____

Prof. Victor Piana de Andrade _____

Profa. Vanessa Fortes Zschaber Marinho _____

Prof. Wagner Luiz Tafuri (Coordenador) _____

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

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



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

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



DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, composta pelos professores doutores: Geovanni Dantas Cassali, Ênio Ferreira, Victor Piana de Andrade e Vanessa Fortes Zschaber Marinho, aprovou a defesa da dissertação intitulada: **“CARCINOMA MICROPAPILAR INVASIVO DA GLÂNDULA MAMÁRIA CANINA: ANÁLISE CLÍNICO-PATOLÓGICA, IMUNO-HISTOQUÍMICA E DETERMINAÇÃO DA SOBREVIDA GLOBAL”**, apresentada pelo mestrando **CONRADO DE OLIVEIRA GAMBA**, para obtenção do título de Mestre em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia - Área de Concentração em Patologia Geral, da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 17 de fevereiro de 2012.

Prof. Geovanni Dantas Cassali
Orientador

Prof. Ênio Ferreira
Coorientador

Prof. Victor Piana de Andrade

Profa. Vanessa Fortes Zschaber Marinho

*“A mente que se abre a uma idéia,
jamais voltará ao seu tamanho original”*

Albert Einstein

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Enivaldo e Enéia

Aos meus irmãos Estêvão e Thiago

A minha amada Elis

AGRADECIMENTOS

Aos meus maravilhosos pais Enivaldo e Enéia por terem me dado a vida. Pelo amor, carinho e exemplo de vida. Sem eles não teria conseguido nada.

Aos meus irmãos Thiago e Estêvão pelo companheirismo, carinho e força nos momentos mais difíceis. Vocês foram imprescindíveis para a superação de todos os obstáculos.

À minha amada Elis por ser muito especial e pelo amor incondicional, paciência e companheirismo.

Ao meu orientador Geovanni Dantas Cassali por todos os ensinamentos científicos e de vida. E que além de orientador se tornou um grande amigo.

Ao meu co-orientador Enio Ferreira pela amizade, pelos ensinamentos científicos e pela total disponibilidade.

Ao estagiário e amigo Éverton (juninho) por estar sempre bem disposto nos momentos que mais precisei e que foi muito importante na execução deste trabalho.

Aos meus colegas de pós-graduação e amigos Liliane, Cristina, Karine, Patrícia Auler, Gustavo, Cecília, Marina, Diego e Lorena pela amizade, momentos de descontração e que sempre estiveram dispostos a me ajudar nos momentos mais difíceis.

Aos estagiários Bruna, Juliana, Fabiana, Clarissa, Ana Paula, Ana Maciel e Iasmin, sempre muito solícitos e divertidos.

Aos grandes amigos Hermilton, Nelsa e Celso Khosa pelo pleno apoio e companheirismo.

À professora e amiga Alessandra Estrela Lima que disponibilizou as amostras da Universidade Federal da Bahia e que deu todo o suporte científico necessário para a execução deste estudo.

À Gleidice Eunice Lavallo pelo apoio e por disponibilizar todas as informações necessários para o desenvolvimento deste estudo.

Ao Setor de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária/UFMG por ter cedido as amostras do arquivo de blocos para a execução do estudo.

Às professoras Josiane Bonel-Raposo e Cristina Gevehr Fernandes da Universidade Federal de Pelotas pela amizade e por todos os ensinamentos de patologia veterinária.

A todos os professores e colegas do Instituto de ciências Biológicas e do Setor de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG que foram muito importantes nesta caminhada.

À Pró-reitoria de Pesquisa da UFMG pelos auxílios financeiros através do programa de melhoria qualitativa da produção científica.

Ao CNPq, CAPES, FAPEMIG e UFMG que tornaram este trabalho exequível.



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 TABELAS	13
LISTA DE APÊNDICES	13
LISTA DE ANEXOS	13
LISTA DE ABREVIATURAS	14
RESUMO	15
ABSTRACT	16
1 - INTRODUÇÃO	17
2 - REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 - Neoplasias mamárias caninas: aspectos clínicos e patológicos	18
2.2 - Carcinomas micropilares invasivos nas espécies humana e canina: aspectos comparativos	22
3 - JUSTIFICATIVA	25
4 - HIPÓTESE	25
5 - OBJETIVOS	26
5.1 - Objetivo geral	26
5.2 - Objetivos específicos	26
6 - MATERIAL E MÉTODOS	26
6.1 - Aspectos éticos	26
6.2 - Espécimes mamários	26
6.3 - Estadiamento clínico	27
6.4 - Análise histopatológica	27
6.5 - Graduação histológica	27
6.6 - Análise de sobrevivência global.....	28
6.7 - Análise imunofenotípica	28
7 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
Artigo - Histology and immunohistochemistry of invasive micropapillary carcinoma of the canine mammary gland, a retrospective study	31
8 - CONCLUSÕES FINAIS	55
9 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
10 - REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS	56
11 - APÊNDICES	63

12 - ANEXOS	67
-------------------	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Dados clinico-patológicos descritos na literatura para CMI na espécie humana.....	24
TABELA 2 – Reagentes e métodos imuno-histoquímicos utilizados	29

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A - Produção científica relacionada à dissertação o período de março de 2010 a março de 2012	63
APÊNDICE B - Produção científica não relacionada à dissertação no período de março de 2010 a março de 2012	63

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal – CETEA..	67
ANEXO B - Sistema TNM de estadiamento clínico	68
ANEXO C - Graduação histológica de neoplasias mamárias caninas	69
ANEXO D - Comprovação da submissão de artigo científico para a revista The Veterinary Journal	70
ANEXO E - Comprovação da solicitação de revisão de artigo científico emitida pela revista The Veterinary Journal	71
ANEXO F - Comprovação de re-submissão de artigo referente à dissertação para a revista The Veterinary Journal	73

LISTA DE ABREVIATURAS

ASCO/CAP - Sociedade Americana de Oncologia Clínica/Colégio Americano de Patologia

CETEA/UFMG - Comitê de Ética para Experimentação Animal/Universidade Federal de Minas Gerais

CGA - Campos de Grande Aumento

CK - Citoqueratina

CMI - Carcinoma Micropapilar Invasivo

DAB - Diaminobenzidina

EGFR - Receptor de Fator de Crescimento Epidermal

EMA - Antígeno de Membrana Epitelial

HE – Hematoxilina e eosina

HER - Fator de Crescimento Epidermal

HER-2 - Receptor de Fator de Crescimento Epidérmal 2

PCNA - Antígeno Nuclear de Proliferação Celular

OMS - Organização Mundial da Saúde

RE - Receptor de Estrógeno

RP - Receptor de Progesterona

TEM - Transição Epitelial Mesenquimal

RESUMO

O carcinoma micropapilar invasivo mamário, apesar de ser uma entidade de rara ocorrência em humanos e cadelas, trata-se de uma neoplasia importante devido ao seu comportamento agressivo o que reflete, na maioria das vezes, em um prognóstico desfavorável. O objetivo desse estudo foi caracterizar os aspectos clínico-patológicos e imunofenotípicos, e a determinação da sobrevida global de carcinomas micropapilares invasivos em caninos. Foram analisados 22 casos com predomínio das neoplasias >3cm (15/19; 78,9%) e de casos com metástase para linfonodos regionais (16/16; 100%). Duas amostras (2/9; 22,2%) apresentaram metástase à distância. Seis casos revelaram estadio IV (6/6; 100%). Os carcinomas micropapilares invasivos foram classificados em puros (15/22; 68,2%) ou mistos (7/22; 31,8%), quando associadas, ou não, a outros padrões de crescimento epitelial neoplásico. Os carcinomas micropapilares invasivos apresentaram, em sua maioria, grau histológico moderado (16 grau II) e invasão vascular (86,4%), com sobrevida global média de 120 dias. Diferenças de sobrevida entre os subtipos puro e misto não foram observadas. A positividade epitelial para EMA e negatividade das formações císticas para CD31, p63 e CKAE1/AE3 permitiram a confirmação diagnóstica dos carcinomas micropapilares invasivos. Observou-se positividade epitelial para p63 (4/20; 20%) e CK34βE12 (20/22; 90,9%). Amostras positivas para receptor de estrógeno (19/20; 95%) e receptor de progesterona (19/20; 95%) predominaram e ausência de superexpressão de HER-2 (19/22; 86,4%) e EGFR (18/22; 81,8%) foi observada. O índice de proliferação celular médio foi de 14,8%. Diante desses achados podemos concluir que os carcinomas micropapilares invasivos caninos possuem comportamento agressivo com altas taxas de metástase para linfonodos regionais e sobrevida global curta, assim como observado em humanos, o que demonstra a importância do reconhecimento dessa lesão da glândula mamária em caninos.

ABSTRACT

Invasive micropapillary carcinoma of the mammary gland, despite its rare occurrence in humans and dogs, is an important neoplasm due to its aggressive behaviour and poor prognosis. The aim of this study was to characterise the clinicopathological and immunophenotypical characteristics and to determine the overall survival of canine invasive micropapillary carcinoma. Of the 22 cases of invasive micropapillary carcinoma selected for analysis, the majority had >3cm neoplasms (15/19; 78.9%) and lymph node metastases (16/16; 100%). Only two cases (2/9; 22.2%) showed distant metastasis. Six cases were classified as stage IV (6/6; 100%). Invasive micropapillary carcinoma were classified as pure (15/22; 68.2%) and mixed (7/22; 31.8%) types. A predominance of vascular invasion (86.4%) and moderate histological grade (16 grade II) was observed. The average overall survival was 120 days and there were no differences between pure and mixed subtypes. Positive immunohistochemical staining for the epithelial marker EMA and negative staining of cystic formations for CD-31, p63 and CKAE1AE3 confirmed the micropapillary nature of the invasive micropapillary carcinomas. Some cases showed positive epithelial staining for p63 (4/20; 20%) and CK34βE12 (20/22; 90.9%). Most cases were positive for ER (19/20; 95%) and PR (19/20; 95%) and lacked overexpression of HER-2 (19/22; 86.4%) and EGFR (18/22; 81.8%). The mean proliferation index was 14.8%. These findings demonstrate that similar to human, canine invasive micropapillary carcinoma have aggressive behaviour with high rates of metastasis to regional lymph nodes and short overall survival and may be considered important lesions of the mammary gland in canines.

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias mamárias estão entre os tumores que mais comumente acometem cadelas (MOULTON, 1990). De acordo com a literatura 41 a 53% destes tumores são malignos (BRODY *et al.* 1983), sendo 90% deles carcinomas (GILBERTSON *et al.*, 1983).

O sistema para classificação de neoplasias mamárias caninas da Organização Mundial da Saúde (OMS) (MISDORP *et al.*, 1999) classifica os carcinomas com base no padrão histológico em túbulo-papilar, sólido, anaplásico, carcinoma em tumor misto e em menor número variantes especiais de carcinomas invasores (MISDORP *et al.*, 1999). Diversos subtipos histológicos que não constam neste sistema foram recentemente descritos. Dentre eles destacam-se os Carcinomas Micropapilares Invasivos (CMI) que apesar do baixo número de casos estudados, demonstram comportamento biológico extremamente agressivo com linfotropismo, altas taxas de metástase para linfonodos regionais e sobrevida global curta (CASSALI *et al.* 1999a, 2002a; GAMA *et al.*, 2008).

Em neoplasias mamárias caninas fatores clínicos e patológicos são frequentemente utilizados para a determinação prognóstica. Tumores maiores que 5 cm, comprometimento de linfonodos regionais e grau histológico elevado são características associadas com neoplasias mais agressivas (FERREIRA *et al.*, 2009; KARAYANNOPOULOU *et al.*, 2005). Adicionalmente, marcadores prognósticos, estudados pela técnica de imuno-histoquímica, contribuem para a compreensão do comportamento biológico destes tumores e resultados de negatividade para receptores hormonais, superexpressão de Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico 2 (HER-2) e de Receptor de Fator de Crescimento Epidermal (EGFR) e índice de proliferação celular elevado são características típicas de neoplasias mamárias de prognóstico desfavorável (BERTAGNOLLI *et al.*, 2011; DUTRA *et al.*, 2004; GERALDES *et al.*, 2000; PEÑA *et al.*, 1998).

Diante da escassez de estudos com CMI em cadelas e buscando maior compreensão do comportamento biológico e determinação do significado clínico de CMI, no presente estudo avaliaram-se as características clinico-patológicas e imunofenotípicas e determinou-se a sobrevida global de CMI da glândula mamária em caninos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Neoplasias mamárias caninas: aspectos clínicos e patológicos

As neoplasias mamárias estão entre os tumores mais comuns que acometem fêmeas caninas (MOULTON, 1990). Sua incidência tem se mostrado variável de acordo com a localização geográfica dos estudos. Pesquisas realizadas na Califórnia, Suécia e Reino Unido apontaram incidência anual em cães de 198,8/100.000, 111/10.000 e 205/100.000, respectivamente (DOBSON *et al.*, 2002; DORN *et al.*, 1968; EGENVALL *et al.*, 2005).

Em relação à predisposição racial alguns autores apontam maior ocorrência em raças puras quando comparadas com raças mistas (KURZMAN; GILBERTSON, 1986; PRIESTER; MANTEL, 1971). As raças mais acometidas variam de acordo com a localização geográfica, porém os poodles, English Springer Spaniels, Brittany Spaniels, Cocker Spaniels, English Setters, Pointers, German Shepherds, Maltês, Yorkshire Terriers e Dachshunds demonstram maior incidência em diversos estudos (GOLDSCHMIDT *et al.*, 2001; KURZMAN; GILBERTSON, 1986; YAMAGAMI *et al.*, 1996).

As neoplasias mamárias caninas geralmente acometem fêmeas, sendo a incidência em machos estimada em 0 a 2,7% (BRODY *et al.*, 1983; MERLO., 2008). A média de idade dos animais acometidos é de 10 a 11 anos com aumento da incidência a partir dos seis anos e rara ocorrência antes dos quatro anos de idade (WITHROW; VAIL, 2007). Geralmente cães com menos de cinco anos são acometidos por neoplasias mamárias benignas (KURZMAN; GILBERTSON, 1986).

Neoplasias mamárias caninas geralmente são multicêntricas (BENJAMIM *et al.*, 1999; FOWLER *et al.*, 1974) e as glândulas mamárias caudais (abdominal caudal e inguinal) são mais acometidas do que as glândulas craniais (torácica cranial, torácica caudal e abdominal cranial), porém a localização e a multicentricidade parecem não interferir no prognóstico dos animais portadores (BRODY *et al.*, 1983; FIDLER; BRODEY, 1967; KURZMAN; GILBERTSON, 1986)

A determinação do prognóstico para cães portadores de neoplasias mamárias é difícil, pois uma grande variação no comportamento biológico destes tumores é observada. A definição de subpopulações caninas de padrões distintos de sobrevida facilita grandemente a determinação do prognóstico e decisões relacionadas a terapias adjuvantes (KUZMAN; GILBERTSON, 1986). O sistema TNM de estadiamento clínico para carcinomas mamários caninos estabelecido pela OMS avalia o tamanho tumoral (T1:<3cm; T2: 3-5cm; T3:>5cm), envolvimento de linfonodos regionais (N0: sem metástase; N1: com metástase) e metástase à distância (M0: sem metástase; M1: com metástase), posteriormente permitindo a categorização dos animais em cinco estádios (I,II,III,IV,V) (OWEN, 1980) (**ANEXO A**). Estudos em caninos demonstram que este sistema possui valor prognóstico e animais em estágio \geq II possuem sobrevida mais curta do que os em estágio I (PHILIPERT *et al.*, 2003; SORENMO *et al.*, 2003).

O tamanho tumoral, além de estar inserido no sistema TNM, é considerado um fator prognóstico independente para o câncer de mama canino. Yamagami *et al.* (1996) descreveram pior prognóstico para animais com neoplasias de tamanho elevado (T2 e T3), assim como Ferreira *et al.* (2009) que demonstraram associação de lesões maiores de 5 cm (T3) com malignidade, elevada taxa de proliferação e baixa positividade para Receptor de Progesterona (RP). O aumento de tamanho tumoral também tem sido relacionado com a diminuição da expressão de Receptor de Estrógeno (RE) α (NIETO *et al.* 2000).

O status de linfonodos regionais tem um forte impacto na sobrevida de cães com tumores mamários (HELLMÉN *et al.*, 1993; SORENMO, 2003). Animais com metástase para linfonodos (estádio IV) possuem uma expectativa de vida mais curta do que os sem comprometimento do linfonodos, assim como cadelas com metástase à distância (estádio V), que possuem pior prognóstico do que as sem metástase ou apenas com metástase para linfonodos regionais (KARAYANOPOULOU *et al.*, 2005; YAMAGAMI *et al.*, 1996). Estudo com análise univariada demonstrou valor prognóstico estatisticamente significativo para o status de linfonodos regionais, porém esta característica não foi considerada um fator prognóstico independente em análise multivariada (HELLMÉN *et al.*, 1993).

De acordo com a literatura 41 a 53% dos tumores mamários caninos são malignos (BRODY *et al.*, 1983), sendo 90% deles carcinomas (GILBERTSON *et al.*, 1983). O sistema de classificação proposto pela OMS subdivide os carcinomas mamários caninos em carcinomas não infiltrativos, complexos (proliferação epitelial e mioepitelial), simples (proliferação epitelial) e carcinomas em tumores mistos (proliferação epitelial, mioepitelial e mesenquimal). Levando em consideração o padrão morfológico descritivo, os carcinomas simples podem ser classificados em túbulo-papilar, sólido e anaplásico. Além disso, variantes especiais de carcinomas invasores como o carcinoma fusiforme, de células escamosas, rico em lipídeos e o carcinoma mucinoso, apesar de raros, também são reconhecidos (MISDORP *et al.*, 1999). Em relação à frequência dos carcinomas, resultados divergentes são observados na literatura. Dois estudos epidemiológicos avaliando 1040 e 1649 casos de neoplasias mamárias caninas apontaram os carcinomas em tumor misto (25,35%) e carcinomas simples (29,1%) como subtipos mais prevalentes, respectivamente (CASSALI *et al.*, 2009; OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2010).

Outros subtipos de carcinomas não reconhecidos pelo sistema de classificação da OMS foram recentemente relatados, dentre eles os CMI, carcinomas secretores e carcinomas lobulares pleomórficos (CASSALI *et al.*, 1999a; CASSALI *et al.*, 1999b; CASSALI *et al.*, 2002a; CASSALI *et al.*, 2002b). Baseado nestes relatos estes subtipos histológicos foram incluídos em um novo sistema de classificação para neoplasias mamárias caninas proposto por Cassali *et al.* (2011).

Assim como a classificação histológica, a diferenciação celular parece ter uma relação direta com o prognóstico de cães portadores de carcinomas mamários (MISDORP *et al.*, 2001). Um sistema de graduação histológica que determina o grau de diferenciação celular de carcinomas mamários tem sido utilizado e baseia-se em características como formação tubular, pleomorfismo nuclear e índice mitótico com posterior alocação da neoplasia em três diferentes graus: I, II e III (ELSTON; ELLIS, 1991) (**ANEXO B**). Em humanos, estudos com grande número de pacientes e longo período de acompanhamento de sobrevida tem comprovado uma forte relação deste sistema de graduação com o prognóstico (ELSTON; ELLIS, 1991). Em cães ele tem sido empregado e carcinomas mamários de alto grau (pouco diferenciados) demonstraram sobrevida mais curta do que carcinomas de grau intermediário

(moderadamente diferenciados) e baixo (bem diferenciados). Um risco de morte 21x maior tem sido apontado para carcinomas indiferenciados (Grau III) quando comparados a carcinomas bem diferenciados (Grau I e II) (KARAYANOPOULOU *et al.*, 2005). As neoplasias indiferenciadas (grau III) também parecem estar associadas com características relacionadas com invasividade como perda de expressão de E-caderinas (REIS *et al.*, 2003).

Assim como o sistema TNM e a graduação histológica, alguns marcadores prognósticos, estudados pela técnica de imuno-histoquímica, podem prever o comportamento biológico e a evolução clínica de pacientes portadores do câncer de mama (ESTEVA; HORTOBAGYI, 2004).

Os RE e RP são fatores de crescimento intermediários normalmente presentes na glândula mamária diretamente relacionados com o grau de diferenciação histológica no câncer de mama humano (MCCARTY *et al.*, 1980; MILLIS *et al.*, 1980). Em cães a avaliação do status de receptores esteróides (RE α e RP) por imuno-histoquímica é recente e tem demonstrado valor prognóstico em análise univariada. A presença de um ou ambos receptores é mais freqüente em neoplasias mamárias benignas quando comparadas com as malignas (LAS MULAS *et al.*, 2005). Em análise multivariada o RE α foi apontado como um fator prognóstico independente. A ausência da expressão do receptor está associada à malignidade e metástase para linfonodos regionais (NIETO *et al.*, 2000).

O HER-2 e o EGFR são membros da família de receptores de fator de crescimento epidermal humano (HER), cuja superexpressão tem sido relacionada com prognóstico desfavorável em neoplasias mamárias humanas (SLAMON *et al.*, 1987; TSUTSUI *et al.*, 2002). Em tumores mamários caninos a superexpressão de HER-2 e EGFR, identificada por imuno-histoquímica, foi recentemente descrita e correlacionada com malignidade (BERTAGNOLLI *et al.*, 2011; DUTRA *et al.*, 2004; GAMA *et al.*, 2009; LAS MULAS *et al.*, 2003). Las Mulas *et al.* (2003) relacionaram a superexpressão de HER-2 com indicadores de prognóstico desfavorável como elevado tamanho tumoral, alto grau histológico, crescimento invasivo e ausência de expressão de receptores hormonais.

O índice de proliferação celular determinado por marcadores relacionados ao ciclo celular como Ki-67 e o Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) tem demonstrado valor prognóstico em carcinomas mamários humanos (BARNARD *et al.*, 1987; SHRESTHA *et al.*, 1992). O anticorpo MIB-1 reage com o antígeno nuclear Ki-67 expresso durante as fases do ciclo celular G1, S, G2 e durante a mitose (GERDES *et al.*, 1984; GERDES *et al.* 1992). Em caninos este anticorpo tem sido frequentemente utilizado na determinação do índice de proliferação celular de tumores mamários (DUTRA *et al.*, 2008; PEÑA *et al.*, 1998) sendo este considerado um fator prognóstico independente (PEÑA *et al.*, 1998) e um forte indicador de metástases e malignidade (NIETO *et al.*, 2000; PEÑA *et al.*, 1998).

Aliado à avaliação de marcadores prognósticos, a determinação diagnóstica a partir de anticorpos específicos para moléculas determinantes de histogênese e de invasão estromal e vascular são de extrema importância na determinação do diagnóstico e do prognóstico em neoplasias mamárias caninas. As citoqueratinas (CK), proteínas de filamentos intermediários, compreendem uma família de 20 diferentes polipeptídeos caracteristicamente encontrados em neoplasias de origem epitelial (MOLL *et al.*, 1982). A pancitoqueratina (CKAE1AE3) é um coquetel de CK comumente utilizado para a determinação da histogênese epitelial de neoplasias e identificação de micrometástases (GAMBA *et al.*, 2011a; YEH; MIES, 2008). Algumas CK de alto peso molecular, como a CK 34βE12, são úteis para o diagnóstico de neoplasias mamárias de origem ductal e evidenciação de áreas de metaplasia escamosa (GOWN; VOGEL, 1984; YAMAGUCHI *et al.*, 2010). A identificação de células mioepiteliais pela proteína p63 e endoteliais por CD-31 são úteis para a identificação de áreas de invasão estromal e vascular, respectivamente (BERTAGNOLLI *et al.*, 2009; GAMBA *et al.*, 2011b).

2.2 Carcinomas micropapilares invasivos nas espécies humana e canina: aspectos comparativos

Os CMI mamário em humanos é uma variante do carcinoma ductal de rara ocorrência primeiramente descrita por Siriaunkgul e Tavassoli (1993) e reconhecida pela OMS como subtipo histológico independente em 2003 (TAVASSOLI; DEVILEE, 2003). Em humanos esta neoplasia é considerada um fenótipo linfotrópico e metastatizante do câncer de mama,

pois geralmente está associada com metástase para linfonodos regionais, metástase à distância e invasão linfática (LUNA MORÉ *et al.*, 2000; MIDDLETON *et al.*, 1999; NASSAR *et al.*, 2001; PATERAKOS *et al.*, 1999; SIRIAUNKGUL; TAVASSOLI, 1993; TRESSERRA *et al.*, 1999; ZEKIOGLU *et al.*, 2004).

Macroscopicamente os CMI humanos revelam tamanhos variáveis com médias que oscilam entre 1,5-4,2cm (KURODA *et al.*, 2004; LUNA MORÉ *et al.*, 2000; MARINHO *et al.*, 2007; PETTINATO *et al.*, 2004; SIRIAUNKGUL; TAVASSOLI, 1993 ZEKIOGLU *et al.*, 2004) e mesmo quando menores que 1cm possuem caráter agressivo e metastatizante (WALSH; BLEIDWEISS, 2001). Em análise histopatológica caracterizam-se por pequenas estruturas papilares, com ausência de tecido fibrovascular central, presentes no interior de formações císticas que, apesar de semelhantes a canais vasculares, apresentam negatividade para marcadores de células endoteliais como o fator VIII e CD-31 (DE LA CRUZ *et al.*, 2004; PETTINATO *et al.*, 2004; SIRIAUNKGUL; TAVASSOLI, 1993). Essas formações ainda demonstram ausência de membrana basal confirmando seu caráter invasivo (SIRIAUNKGUL; TAVASSOLI, 1993). A maior parte dos CMI humanos são de subtipo misto (associado com outros carcinomas) e frequentemente apresentam alto grau histológico e associação com carcinomas ductais *in situ* (LUNA MORÉ *et al.*, 1994; LUNA MORÉ *et al.*, 1996; MARINHO *et al.*, 2007; NASSAR *et al.*, 2001; PATERAKOS *et al.*, 1999; TRESSERRA *et al.*, 1999).

Além da abordagem histopatológica, a análise imuno-histoquímica tem contribuído no diagnóstico definitivo de CMI humano. A imunomarcação para o Antígeno de Membrana Epitelial (EMA) na superfície voltada para o estroma tumoral de grupamentos de células epiteliais é considerada uma característica chave na identificação da neoplasia. Acredita-se que este fenômeno se deva a um processo de reversão de polaridade das células epiteliais que adquirem propriedades secretórias apicais que culminam com expressão aberrante de EMA (NASSAR *et al.*, 2004a; NASSAR, 2004b).

Visando a elucidação do comportamento biológico agressivo dos CMI em humanos a expressão de marcadores prognósticos consolidados tem sido investigada e superexpressão de HER-2, altas taxas de positividade para receptores hormonais (RE e RP) e índice de proliferação celular elevado tem sido demonstrados (LUNA MORÉ *et al.*, 1996; MARCHIÒ

et al., 2008; MIDDLETON *et al.*, 1999; PATERAKOS *et al.*, 1999; TRESSERRA *et al.*, 1999; YAMAGUCHI *et al.*, 2010; WALSH; BLEIDWEISS, 2001). A **TAB. 1** demonstra os principais achados clínico-patológicos e imuno-histoquímicos de CMI humanos observados na literatura.

TABELA 1 - Dados clinico-patológicos descritos na literatura para CMI na espécie humana

Autor	N	TM (cm)	GH III	IL	MLR	RE	RP	HER-2
Siriaungkul (1993)	9	1,5	33%	33%	33%	NA	NA	NA
Tresserra (1999)	15	2,3	60%	NA	60%	92%	92%	NA
Middleton (1999)	14	3-6,2	36%	71%	NA	25%	13%	100%
Paterakos (1999)	21	3,6	66%	NA	95%	61%	50%	78%
Luna Moré (2000)	68	4,2	42%	59%	91%	73%	45%	36%
Walsh (2001)	80	2	67%	62%	72%	91%	70%	59%
Nassar (2001)	83	4	58%	15%	77%	71%	NA	NA
Zekioglu (2004)	53	2,7	82%	75%	69%	68%	61%	54%
De La cruz (2004)	16	3,1	69%	NA	92%	50%	31%	50%
Pettinato (2004)	62	2,8	87%	63%	93%	32%	20%	95%
Kuroda (2004)	27	4	62,9%	88,9%	66,6%	NA	NA	NA
Chen (2008)	100	3,38	32%	69%	84,8%	46%	27%	NA
Yamaguchi (2010)	15	2,3	NA	67%	47%	73%	NA	NA
Marinho (2007)	34	2,4	61,8%	73,5%	73,5%	88,2%	82,4%	2,9%

TM = Tamanho tumoral médio; GH = Grau Histológico; IL = Invasão Linfática; MLR = Metástase para Linfonodos Regionais; RP = Receptor de Progesterona; RE = Receptor de Estrógeno; NA = Não Avaliado pelo artigo.

FONTE: Adaptado de Nassar *et al.*(2004)

Os CMI são um subtipo histológico ainda pouco descrito em cães. O primeiro relato foi publicado por Cassali *et al.* (1999a) que descreveram achados citológicos e histopatológicos em apenas um cão. Posteriormente, dois casos foram descritos relatando achados anátomo-patológicos e imuno-histoquímicos com evidência de positividade para EMA e HER-2, além de índices de proliferação celular elevados. Na avaliação da expressão de RP apenas um caso demonstrou positividade (CASSALI *et al.*, 2002a). Gama *et al.* (2008) relataram nove casos de CMI mistos caninos observando sobrevida global curta, altas taxas de metástase para linfonodos regionais e de invasão linfática e alto grau histológico. Diante destes achados dois novos sistemas para a classificação de neoplasias mamárias caninas foram propostos e incluíram os CMI como subtipo histológico independente (CASSALI *et al.*, 2011; GOLDSCHIMIDT *et al.*, 2011). Porém, para maior compreensão do valor prognóstico e do comportamento biológico da neoplasia, estudos contendo maior número de amostras com avaliação das características clínico-patológicas e da evolução clínica de cadelas portadoras de CMI deveriam ser conduzidos.

3 JUSTIFICATIVA

Diante da escassez de estudos em caninos e do prognóstico desfavorável apresentado pelos CMI em humanos, há a necessidade do reconhecimento e da comprovação do prognóstico desfavorável dos CMI em cadelas. Para isso é necessária a investigação das características clínico-patológicas e imunofenotípicas, além de determinação de sobrevida global de CMI da glândula mamária em cães.

4 HIPÓTESE

Diante do observado nos relatos dos CMI humanos e caninos, os CMI em cadelas podem apresentar índices elevados de: proliferação celular, expressão de receptores hormonais, expressão de receptores de fatores de crescimento, invasão linfática e graduação histológica. Estes achados permitem inferir que, o animal portador do tumor apresenta curto período de sobrevida global quando comparado ao portador de outros subtipos de carcinomas invasivos.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Descrever as características clínico-patológicas, imunofenotípicas e determinar a sobrevida global em CMI da glândula mamária canina.

5.2 Objetivos específicos

- Caracterizar os aspectos histopatológicos dos CMI em cadelas, classificando-os em puros ou mistos, descrevendo as características de relevância para o diagnóstico e prognóstico,
- Avaliar o estadiamento clínico (TNM) e a graduação histológica dos CMI mamários em cadelas,
- Determinar a sobrevida global de cadelas portadoras de CMI da glândula mamária canina.
- Caracterizar os aspectos imunofenotípicos (MIB/Ki67, HER-2/neu, EGFR, RE, RP, CK AE1/AE3, CK34βE12, p63, CD31) dos CMI em cadelas,

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal (CETEA/UFMG), sob protocolo de nº 211/2009 (**Anexo A**).

6.2 Espécimes mamários

Foram selecionados 22 casos de CMI caninos oriundos do material de arquivo da Escola de Veterinária e Laboratório de Patologia Comparada da Universidade Federal de Minas Gerais e do Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal da Bahia.

6.3 Estadiamento clínico

Para o estadiamento clínico foram avaliados o tamanho do tumor (T1 de 0-3 cm; T2: 3-5cm; T3: >5cm), envolvimento neoplásico de linfonodos regionais (N0: livre; N1: metastático) e presença de metástases à distância (M0: sem metástase; M1: com metástase). Posteriormente as amostras foram alocadas em cinco categorias: I (T₁N0M0), II (T₂N0M0), III (T₃N0M0), IV (T₁₂₃N1M0) e V (T₁₂₃N0M1) (OWEN, 1980).

6.4 Análise histopatológica

Amostras foram fixadas em formol tamponado 10%, processadas pela técnica rotineira de inclusão em parafina e coradas com hematoxilina e eosina (HE). Todos os casos foram revisados e reclassificados por dois patologistas veterinários (COG, GDC). Os CMI foram classificados de acordo com os critérios histológicos humanos estabelecidos pela OMS (TAVASSOLI; DEVILEE, 2003) e as lesões mamárias associadas foram classificadas de acordo com os critérios histológicos veterinários de Misdorp *et al.* (1999). Os CMI foram classificados como puros (padrão micropapilar infiltrativo em mais de 75% do tumor) ou mistos (padrão micropapilar infiltrativo em menos de 75% do tumor associado a outro subtipo de carcinoma invasor mamário) (MIDDLETON *et al.*, 1999; ZEKIOGLU *et al.*, 2004). As presenças de áreas carcinomatosas *in situ* do tipo micropapilar, de êmbolos vasculares e de metástases para linfonodos regionais foram avaliadas. As áreas micropapilares *in situ* foram classificadas em baixo, intermediário e alto grau nuclear de acordo com o consenso para a classificação de carcinomas ductais *in situ* humanos (1997).

6.5 Graduação histológica

Os tumores foram graduados pelo sistema de Nottingham (ELSTON; ELLIS, 1991, 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.). Para avaliação do índice mitótico foi utilizado o microscópio BX-41 com ocular de 10x e objetiva de 40x e as mitoses foram contadas em 10 Campos de Grande Aumento (CGA) (ELSTON; ELLIS, 1991, 1998). Para a obtenção do grau histológico combinado do tumor, o escore para cada fator foi somado, resultando em um valor total que variou 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.

6.6 Análise de sobrevida global

A sobrevida global foi definida (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*). A causa de morte foi confirmada após o óbito do animal. As cadelas que vieram a óbito por razões desconhecidas ou causas não relacionadas ao tumor, ou que deixaram de ser acompanhadas foram consideradas censuradas. As curvas de sobrevida foram derivadas da estimativa de Kaplan-Meier. Comparação de sobrevida entre os subtipos puros e mistos foi realizada pelo teste log-rank e os valores foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

6.7 Análise imunofenotípica

Secções histológicas de 4 μm foram obtidas para a realização da técnica de imunohistoquímica com utilização do método biotina-peroxidase e identificação a partir de anticorpo secundário polimerizado (ADVANCE HRP – ready to use – DakoCytomation). Para realização de bloqueio da peroxidase endógena as lâminas foram incubadas em solução de H_2O_2 3% em álcool metílico. Os reagentes foram aplicados pela técnica manual, e o tempo de incubação com o cromógeno Diaminobenzidina (DAB) (DAB substrate system, Dakocytomation) variou de 5 a 10 minutos. Os anticorpos, fontes e diluições, assim como, métodos de recuperação antigênica, pHs e tempo de incubação dos anticorpos estão descritos na **TAB. 2**. Controles positivos e negativos foram utilizados. Nas amostras controle negativo omitiu-se o anticorpo primário substituindo-o por soro normal.

Tabela 2 - Reagentes e métodos imuno-histoquímicos utilizados

Antígeno	Clone	Fabricante	Dilution	Método de RA (T°)	Tempo de incubação (h)
RE	1D5	Dako	1:20	Calor pressurizado (125 °C)	1
RP	HPRA2	Neomarkers	1:20	Calor pressurizado (125 °C)	1
EMA	E29	Dako	1:25	Banho maria (98 °C)	16
Ki-67	Mib-1	Dako	1:25	Calor pressurizado (125 °C) (125°C)	1
P63	4a4	Neomarkers	1:100	Banho maria (98 °C)	16
Citoqueratina	AE1/AE3	Dako	1:100	Banho maria (98 °C)	1
CD-31	JC70A	Dako	1:20	Banho maria (98 °C)	16
Citoqueratina	34βE12	Dako	1:50	Banho maria (98 °C)	1
EGFR	31G7	Zymed	1:100	Banho maria (98 °C)	16
C erb B2	Polyclonal	Dako	1:200	Banho maria (98 °C)	16

RA = Recuperação Antigênica; RE = Receptor de Estrógeno; RP = Receptor de Progesterona; EMA = Antígeno de Membrana Epitelial; EGFR = Receptor de Fator de Crescimento Epidermal

A imunomarcção para EGFR e HER-2 foi avaliada pelos métodos semiquantitativos propostos pela Sociedade Americana de Oncologia Clínica/Colégio Americano de Patologia (ASCO/CAP) (WOLFF *et al.* 2007). As amostras foram classificadas em quatro categorias: negativa com o escore 0 ou 1+, indeterminada com escore de 2+ e positiva com escore 3+. O escore 0 é caracterizado por ausência de marcação da membrana citoplasmática ; 1+ quando a marcação da membrana é fraca e incompleta em qualquer proporção das células tumorais; 2+ quando há marcação completa, desuniforme com intensidade fraca em mais de 10% das células tumorais ou marcação de membrana completa e intensa em 30% ou menos das células tumorais; 3+ com marcação de membrana completa, uniforme e intensa em mais de 30% das células tumorais. Apenas as amostras que apresentaram 3+ foram consideradas positivas. Para avaliação de RE e RP amostras contendo >1% de células tumorais marcadas foram consideradas positivas (HAMMOND *et al.*, 2010). O índice de proliferação celular foi calculado pela contagem de núcleos positivos para Ki-67 em um total de 1000 células neoplásicas (DUTRA *et al.*, 2008). Na avaliação da marcação para CK34βE12 foram consideradas positivas as amostras com intensidade de marcação forte e moderada em mais de

10% das células (YAMAGUCHI *et al.*, 2010). Para os outros marcadores (CKAE1AE3, CD-31 e p63) presença ou ausência de marcação foi considerada para avaliação.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estes tópicos serão apresentados na forma de artigo científico.

Histology and immunohistochemistry of invasive micropapillary carcinoma of the canine mammary gland, a retrospective study

Artigo encaminhado para a revista *The Veterinary Journal*

Histology and immunohistochemistry of invasive micropapillary carcinoma of the canine mammary gland, a retrospective study

Gamba, C.O.^a; Dias, E.J.^a; Ribeiro, L.G.R.^b; Campos, L.C.^a; Estrela-Lima, A.^b; Ferreira, E.^a; Cassali, G.D.^{a*}

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

^b*Departamento de Patologia e Clínicas, Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, Av. Adhemar de Barros, 500, Ondina, 40170-110, Salvador, Bahia, Brazil*

*Corresponding author. Tel.: +5531 34092891.

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

Abstract

Invasive micropapillary carcinoma (IMPCa) of the mammary gland, despite its rare occurrence in humans and dogs, is an important neoplasm due to its aggressive behaviour. The aim of this study was to evaluate the clinicopathological and immunophenotypical characteristics of IMPCa and to determine the overall survival of canines with IMPCa. Of the 22 cases of IMPCa selected for analysis, the majority had > 3 cm neoplasms (15/19, 78.95%) and lymph node metastases (16/16, 100%). Only two cases (2/9, 22.2%) had distant metastases. Histopathology revealed nests of epithelial neoplastic cells localised within empty spaces that lacked a fibrovascular core. IMPCas were classified as either pure (15/22, 68.18%) or mixed (7/22, 31.82%) types. A predominance of moderate histological grade (16 grade II) IMPCa was observed. The average overall survival was 120 days. Positive immunohistochemical staining for Epithelial Membrane Antigen (EMA) and negative staining for CD-31, p63 and cytokeratin (CK) AE1/AE3 in cystic formations confirmed the micropapillary nature of the IMPCa. Some cases showed positive epithelial staining for p63 (4/20, 20%) and CK34 β E12 (20/22, 90.9%). Most cases were positive for Oestrogen Receptor (ER) (19/20, 95%) and Progesterone Receptor (PR) (19/20, 95%) but lacked HER-2 (16/22, 72.72%) and Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) (15/22, 68.18%) overexpression. The mean proliferation index was 14.8%. These findings demonstrate that, similar to human IMPCas, canine IMPCas have aggressive behaviour with high rates of metastasis to regional lymph nodes and short overall survival. Therefore, IMPCas may be considered important lesions of the mammary gland in canines.

Key words: Invasive micropapillary carcinoma; Mammary gland; Dog; Immunohistochemistry

Introduction

Invasive micropapillary carcinoma (IMPCa) of the breast is a recently recognised, unusual type of invasive ductal carcinoma with a unique morphology. This carcinoma variant characteristically shows tumour cells arranged in small clusters that contain a central lumen and visible evidence of micropapillae lacking a fibrovascular core located within clear spaces that appear to be empty. This tumour has a high potential for malignancy and a high incidence of vascular invasion and lymph node metastases (Luna-moreé et al., 1994). The definitive diagnosis of IMPCa is confirmed using immunohistochemical markers such as Epithelial Membrane Antigen (EMA), CD-31 and Cytokeratin (CK) AE1/AE3 (Nassar et al., 2004; Pettinato et al., 2004).

Until now, only 2 case reports and a letter to the editor have described this morphological pattern in canine mammary gland tumours and demonstrated similarities to human IMPCas, such as high incidence of lymph node metastasis, high histological grade and low overall survival rates (Cassali et al., 1999; Cassali et al., 2002; Gama et al., 2008). Based on these findings, IMPCa has been included as an independent subtype to new histological classification systems proposed for canine mammary tumours (Cassali et al., 2011; Goldschmidt et al., 2011).

In canine mammary tumours, several clinical and pathological factors have been utilised to determine prognosis. Poor prognosis has been associated with tumours of more than 5 cm, lymph node metastasis and high histological grade (Karayannopoulou et al., 2005; Ferreira et al., 2009). Hormone receptor negativity, overexpression of HER-2 and Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and a high proliferation index is also frequently associated with

aggressive mammary neoplasms (Peña et al., 1998; Geraldés et al., 2000; Dutra et al., 2004; Bertagnolli et al., 2011).

Because of the limited number of studies evaluating the immunophenotypical features and prognosis of canine IMPCa, our objective was to describe the clinicopathological and immunophenotypical characteristics of IMPCa and to determine the overall survival rate of canine IMPCa.

Materials and methods

Dogs with histopathological diagnosis of mammary gland IMPCa were included in this study. Twenty-two cases of IMPCa were selected from the Veterinary School of the Federal University of Minas Gerais, the Federal University of Bahia and the Laboratory of Compared Pathology in the Institute of Biological Sciences at the Federal University of Minas Gerais, Brazil. The cases were staged according to the TNM clinical staging system for canine mammary tumours. This system evaluates the tumour size (T₁: 0-3 cm; T₂: 3-5 cm; T₃: >5 cm), the neoplastic involvement of regional lymph nodes (N₀: no metastasis; N₁: metastasis) and the presence of distant metastasis (M₀: no metastasis; M₁: metastasis). Afterwards cases are divided into five stages: I (T₁N₀M₀), II (T₂N₀M₀), III (T₃N₀M₀), IV (T_{1,2,3}N₁M₀) and V (T_{1,2,3}N_{0,1}M₁) (Owen, 1980). Tumour specimens were collected, fixed in 10% neutral buffered formalin solution and embedded in paraffin. Afterwards, 4 µm histological sections were obtained from these fragments and stained with Hematoxylin and Eosin. All cases were reviewed and reclassified independently by two veterinary pathologists (COG, GDC). The IMPCa was classified according to the WHO human histological classification criteria (Tavassoli and Deville, 2003) and the associated mammary lesions were classified according to veterinary classification criteria (Misdorp et al., 1999). We defined pure IMPCa as all

carcinomas with a greater than 75% infiltrating micropapillary pattern and mixed IMPCa as all carcinomas with a less than 75% infiltrating micropapillary pattern associated with other infiltrating carcinomas (Middleton et al., 1999; Zekioglu et al., 2004). *In situ* micropapillary carcinoma areas, vascular emboli and metastasis to regional lymph nodes were evaluated. The *in situ* micropapillary areas were classified as low, intermediate and high nuclear grade according to the consensus conference on the classification of ductal carcinomas *in situ* (The consensus conference committee, 1997). IMPCas were graded according to the Nottingham grading system (Elston and Ellis, 1991, 1998).

Overall survival time was defined (in days) as the period between surgery and death resulting from the cancer. The follow-up period was 330 days. Dogs that died from other causes were censored at the time of death. The survival rate was calculated using the Kaplan-Meier method; statistical significance was examined using a log-rank test and $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Consecutive 5- μm sections were obtained and mounted on silanated slides for immunohistochemical analysis. A biotin-peroxidase system was used for immunohistochemical procedures and secondary antibodies were identified using Advance HRP. Endogenous peroxidase activity was blocked with a solution of 3% H_2O_2 in methyl alcohol. Reagents were applied manually and immunoreactivity was visualised by incubating the slides for 10 min with diaminobenzidine (DAB Substrate System; Laboratory Vision). The antibodies, sources, dilutions, antigen retrieval, pH and incubation times are described in Table 1. Sections from a known HER-2, EGFR, Oestrogen Receptor (ER), Progesterone Receptor (PR), EMA, CK AE1AE3, CK34 β E12, MIB-1 and p63 positive canine mammary

carcinoma were used as positive controls. For CD-31, normal vessels within the tumour were used as an internal positive control. Negative controls were assessed using normal serum (Ultra V Block, Laboratory Vision) as the primary antibody.

HER-2 and EGFR expression were determined by epithelial cell membrane staining and scored according to the guidelines established by the American Society of Clinical Oncology, College of American Pathologists (ASCO/CAP) (Wolff et al., 2007). Staining for ER and PR was evaluated, and cases were scored positive if nuclear staining was present in 1% or more of the tumour cells (Hammond et al., 2010). The proliferative index was calculated by counting the number of nuclei positive for Ki-67 (anti-MIB-1) staining in a total of 1000 neoplastic cells from each lesion (Dutra et al., 2008). Strong immunoreactivity of CK34 β E12, regardless of the extent, and moderate-to-weak expression in more than 10% of the total tumour area was defined as positive staining (Yamaguchi et al., 2010). The presence or absence of other markers (CKAE1AE3, CD-31 and p63) was also considered.

All procedures were performed under the appropriate guidelines and with the approval of the Ethics Committee for Animal Experimentation (CETEA/UFMG), protocol 211/2009.

Results

The ages of the animals at the time of surgery ranged from 7 to 13 years (mean 10.95 years \pm 1.80). Multi-centric localisation was predominantly observed (12/20; 60%) in relation to inguinal (6/20; 30%), cranial thoracic (1/20; 5%) and caudal abdominal (1/20; 5%). In two remaining cases, the localisation was not confirmed. Tumour size was evaluated in 19 cases and classified as T1 (4/19; 21%), T2 (5/19; 26.3%) or T3 (10/19; 52.6%). The status of the

regional lymph node was evaluated in 16 cases, and 100% showed metastasis. Only two cases were positive for distant metastases out of the nine cases evaluated (22.2%). Metastasis to the iliac lymph node and lung were observed in mixed and pure IMPCa, respectively. The clinical staging was possible in only 6 cases, and 100% were classified as stage IV.

All of the cases of IMPCa showed the presence of numerous irregular stromal cystic formations with filled-out nests of epithelial cells in a morular pattern (Fig. 1a). In a few tumours, a lumen was present in the cluster of cells. Neoplastic epithelial cells were characterised as polygonal cells with eosinophilic cytoplasm and variable cellular pleomorphisms (Fig. 1b). The tumours showed pure (15/22, 68.2%) and mixed micropapillary patterns (7/22, 31.8%) (papillary carcinoma, 4/7, 57.1%; carcinomas arising from benign mixed tumours, 2/7, 28.6%; carcinosarcoma, 1/7, 14.3%). Most of the cases were moderate grade (grade II, 16/22; 72.7%) as opposed to high grade (grade III, 3/22; 13.6%) and low grade (grade I, 3/22; 13.6%). *In situ* micropapillary carcinoma was associated with infiltrating carcinomas in 14 cases (63.6%) (Fig. 1c) and showed intermediate (8/14; 57.1%) and high (6/14; 42.9%) nuclear grade. All 16 lymph nodes evaluated contained metastatic foci in the micropapillary pattern (13/16; 81.2%) (Fig. 1d) or mixed pattern (micropapillary and another patterns) (3/16; 18.8%). Neoplastic emboli in the micropapillary pattern were also observed (19/22; 86.4%). The clinicopathological features of pure and mixed IMPCa are summarised in Table 2.

In this study, survival data were available for 17 cases, and 14 dogs (82.3%) died in consequence of the mammary tumour (2 of the 14 dogs were euthanized due to the disease). Eleven of these fourteen dogs presented only regional metastasis, one presented regional and

distant metastasis and two had unconfirmed information regarding regional and distant metastasis. Only one canine (5.9%) died from other causes (hemorrhagic diathesis) 8 days after surgery, and two canines (11.8%) survived 30 days after surgery. The median overall survival was 120 days. Although only a low number of cases were evaluated, the median overall survival for the pure type (120 days) was shorter than for the mixed type (180 days) ($P = 0.62$).

The immunohistochemical results for HER-2, EGFR, ER, PR, CKAE1/AE3, CK34 β E12, p63 and EMA staining are shown in Table 3. All of the cases evaluated showed intense cytoplasmic staining for cytokeratin AE1/AE3 and staining on the stromal-facing surface of the cell clusters (basal), which accentuated the outlines of the micropapillary units by forming a distinct band on this surface external membrane staining for EMA (Fig. 2a). Positive staining for CD-31 was observed in the cytoplasm of endothelial cells of the normal vascular spaces in the peri-tumour region and was not observed in cystic formations (Fig. 2b). A majority of the samples were positive for CK34 β E12 (20/22; 90.9%) (Fig. 2c).

HER-2 (16/22; 72.7%) and EGFR (15/22; 68.2%) were not overexpressed. Immunostaining for p63, Mib-1, ER and PR was performed in only 20 cases. Negative staining for p63 on the walls of cystic formations differed from the staining observed in normal mammary glands, indicating the invasive areas of this tumour (Fig. 2d). Positive nuclear p63 protein staining in epithelial cell nests localised within cystic spaces was observed in four cases (20%). There was a predominance of positive staining for the ER (19/20; 95%) (Fig. 3a) and the PR (19/20; 95%) (Fig. 3b). The proliferation index determined from the amount of nuclear staining for Mib-1 ranged from 1.7% to 65.9% (mean $14.8 \pm 14.1\%$).

Discussion

IMPCas are extremely aggressive neoplastic entities in humans (Luna More et al., 1994). In canines, IMPCas seem to behave similarly to humans, as demonstrated in the few cases of IMPCas previously reported as well as in this study (Cassali et al., 1999; Cassali et al., 2002; Gama et al., 2008). Despite widely varying tumour sizes in humans and dogs (Siriaunkgul & Tavassoli, 1993; Kuroda, 2004; Pettinato et al., 2004; Zekioglu et al., 2004; Gama et al., 2008), lymph node metastases are frequently observed in both species (Walsh & Bleiweiss, 2001; Gama et al., 2008). In this study, we observed lymph node metastases in all of the cases evaluated, including T1 cases.

Upon histopathological analysis, we found a predominance of moderate histological grade IMPCa in canines compared to a predominance of high grade IMPCa previously described in human IMPCa (Walsh & Bleiweiss, 2001; Marinho, 2007). In this study, *in situ* micropapillary areas were associated with an IMPCa invasive component. In human IMPCa, the intraductal component that accompanies these tumours often has a micropapillary pattern and typically has intermediate to high-grade nuclei. By contrast, more common low-grade nuclear intraductal micropapillary carcinomas are generally associated with well differentiated invasive ductal carcinomas (Walsh & Bleiweiss, 2001).

The 2003 World Health Organization histological classification of human breast tumours does not specify the amount of micropapillary invasive areas required for a diagnosis of IMPCa, and no consensus has been reached in the literature (Luna-moré et al., 1994; Middleton et al.,

1999; Amendoeira et al., 2003; Zekioglu et al., 2004). In this study, the mixed subtypes, even when combined with tumours with a better prognosis, such as carcinoma arising from benign mixed tumours and papillary carcinomas, showed a poor prognosis similar to the pure subtype with lymph node metastases and a shorter overall survival.

All of the cases included in this study were positive for EMA and CKAE1/AE3. The empty spaces surrounding the micropapillae of the carcinoma cell nests were not surrounded by endothelial cells (negative for CD-31), myoepithelial cells (negative for p63) or epithelial cells (negative for CK AE1/AE3), thus confirming the infiltrative micropapillary nature of this tumour. In this study, high rates of CK34 β E12-positive staining were observed. In human IMPCa, CK34 β E12-positivity has been described (Yamaguchi et al., 2010). In humans, CK34 β E12 is considered to be a ductal histogenesis marker (Gown & Vogel, 1984); thus, the predominance of positive samples for CK34 β E12 confirms the ductal origin of canine IMPCa.

Nuclear staining for p63 in human IMPCa was previously described and explained by the occurrence of squamous metaplasia, which was confirmed by morphological and immunohistochemical analyses (positive for CK34 β E12 and involucrin) (Yamaguchi et al., 2010). In our study, p63-positive samples showed morphological features typical of squamous metaplasia and CK34 β E12-positivity.

High rates of positivity for hormonal receptors have been described in human IMPCa, and were also observed in this study (Luna-moré et al., 1994; Walsh & Bleiweiss, 2001; De La Cruz et al., 2004; Pettinato et al., 2004; Weigelt et al., 2008). Hormonal receptor positivity is generally associated with a favourable prognosis and well-differentiated neoplasms; thus,

human and canine IMPCa seem to differ in aggressiveness compared with other breast cancers showing these characteristics.

EGFR and HER-2/neu are members of the HER growth factor receptor family whose overexpression has been associated with poor prognosis in human breast cancer (Schippering et al., 2007). Human IMPCa has been described as having a low index of HER-2 and EGFR overexpression, similar to the findings observed in our study (Kim et al., 2005; Marchiò et al., 2008).

Based on the median overall survival of 120 days observed in this study and the 3 month survival described by Gama et al. (2008), canine IMPCa has a median overall survival that is shorter than that of canine papillary and solid carcinomas (median survival 426 days) (Hellmén et al., 1993) and metaplastic and ductal carcinomas (median survival 908 days) (Lavalle et al., 2009). Overall survival in humans with IMPCa has been described to be shorter than that for humans with ductal carcinomas regardless of the percentage of micropapillary invasive areas (De La Cruz et al., 2004).

Conclusions

Anatomopathological and immunohistochemical findings are similar in human and canine IMPCa. Regardless of a pure or mixed subtype diagnosis, IMPCa is associated with a poor prognosis, which characterises this lesion as an important neoplastic entity of the canine mammary gland.

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 has been financially supported by “Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais” (FAPEMIG), “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq), “Pro-Reitoria de Pesquisa da UFMG” and “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES), Brazil.

References

- Amendoeira, I., Magalhães, J., Damasceno, M., 2003. Invasive Micropapillary Carcinoma of the Breast: Are the Pure Forms More Aggressive than the Mixed Forms? *Breast Journal* 9, 337–338.
- 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(8), 312-317.
- Cassali, G.D., Gärtner, F., Vieira da Silva, M.J., Schmitt, F.C., 1999 Cytological diagnosis of a metastatic canine mammary tumor in pleural effusion. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 51(4), 307- 310.
- Cassali, G.D., Serakides, R., Gartner, F., Schmitt, F.C., 2002. Invasive micropapillary carcinoma of the dog mammary gland. A case report. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 24(4), 366–369.
- Cassali, G.D, Lavallo, G.E., De Nardi, A.B., Ferreira, E., Bertagnolli, A.C., Estrela-Lima, A., Alessi, A.C., Daleck, C.R., Salgado, B.S., Fernandes, C.G., Sobral, R.A., Amorim, R.L. Gamba, C.O., Damasceno, K.A., Auler, P.A., Magalhães, G.M., Silva, J.O., Raposo, J.B., Ferreira, A.M.R., Oliveira, L.O., Malm, C., Zuccari, D.A.P. C., Tanaka, N.M., Ribeiro, L.R., Campos, L.C., Souza, C.M., Leite, J.S., Soares, L.M.C., Cavalcanti, M.F., Fonteles, Z.G.C., Schuch, I.D., Paniago, J., Oliveira, T.S., Terra, E.M., Castanheira, T.L.L., Felix, A.O.C., Carvalho, G.D., Guim, T.N., Guim, T.N., Garrido, E., Fernandes, S.C., Maia, F.C.L., Dagli, M.L.Z., Rocha, N.S., Fukumasu, H., Grandi, F., Machado, J.P., Silva, S.M.M.S., Bezerril, J.E., Frehse, M.S., Almeida, E.C.P., Campos, C.B., 2011. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. *Brazilian Journal Veterinary Pathology* 4(2), 153-180.

- De La Cruz, L., Moriya, T., Endoh, M., Watanabe, M., Takeyama, J., Yang, M., Oguma, M., Sakamoto, K., Suzuki, T., Hirakawa, H., Orita, Y., Ohuchi, N., Sasano, H., 2004. Invasive micropapillary carcinoma of the breast: Clinicopathological and immunohistochemical study. *Pathology International* 54, 90–96.
- 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.
- Dutra, A.P., Granja, N.V.M., Schmitt, F.C., Cassali, G.D., 2004. c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 37(11), 1673-1681.
- Elston, C.W., Ellis, I.O., 1991. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 19, 403-410.
- Elston, C.W., Ellis, I.O., 1998. Assessment of histological grade. In: *The breast*, Third Ed. Churchill Livingstone, London, pp. 365-384.
- Ferreira, E., Bertagnolli, A.C., Cavalcanti, M.F., Schmitt, F.C., Cassali, G.D., 2009 The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. *Veterinary Comparative Oncology* 7(4), 230–235.
- Gama, A., Alves, A., Schmitt, F.C., 2008. Clinicopathologic features of mammary invasive micropapillary carcinoma (IMC) in dogs. *Veterinary Pathology* 45(4), 600-601.
- Geraldes, M., Gärtner, F., Schmitt, F., 2000. Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours. *Veterinary Record* 146, 403-406.
- Goldschmidt, M., Penã, L., Rasotto R., Zappulli, V., 2011. Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary pathology* 48, 117-131.
- Gown, A.M., Vogel, A.M., 1984. Monoclonal Antibodies to Human Intermediate Filament Proteins II. Distribution of Filament Proteins in Normal Human Tissue. *American Journal of Pathology* 114, 309-321.
- Hammond, M.E., Hayes, D.F., Dowsett, M.D., Allred, D.C., Hagerty, K.L., Badve, S., Fitzgibbons, P.L., Francis, G., Goldstein, N.S., Hayes, M., Hicks, D.G., Lester, S., Love, R., Mangu, P.B., McShane, L., Miller, K., Osborne, C.K., Paik, S., Perlmutter, J., Rhodes, A., Sasano, H., Schwartz, J.N., Sweep, F.C.G., Taube, S., Torlakovic, E.E., Valenstein, P., Viale, G., Visscher, D., Wheeler, T., Williams, R.B., Wittliff, J.L., Wolff, A.C., 2010. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 28, 2784-2795.

- Hellmén, E., Bergström, R., Holmberg, L., Spangberg, 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.
- Karayannopoulou, M., Kaldrymidou, E., Constantinidis, T.C., Dessiris, A., 2005. Histological Grading and Prognosis in Dogs with Mammary Carcinomas: Application of a Human Grading Method. *Journal Comparative Pathology* 133, 246–252.
- Kim, M.J., Gong, G., Joo, H.J., Ahn, S.H., Ro, J.Y., 2005. Immunohistochemical and Clinicopathologic Characteristics of Invasive Ductal Carcinoma of Breast With Micropapillary Carcinoma Component. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 129, 1277-1282.
- Kuroda, H., Sakamoto, G., Ohnisi, K., Itoyama, S., 2004. Clinical and Pathologic Features of Invasive Micropapillary Carcinoma. *Breast Cancer* 11, 169-174.
- 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.
- Luna-moreé, S., Gonzalez, B., Acedo, I., Rodrigo, I., Luna, C., 1994. Invasive micropapillary carcinoma of the breast. A new special type of invasive mammary carcinoma. *Pathology Research and Practice* 190, 668-674.
- Marchiò, C., Irvani, M., Natrajan, R., Lambros, M.B., Savage, K., Tamber, N., Fenwick, K., Mackay, A., Senetta, R., Di Palma, S., Schmitt, F.C., Bussolati, G., Ellis, L.O., Ashworth, A., Sapino, A., Reis-Filho, J.S., 2008. Genomic and immunophenotypical characterization of pure micropapillary carcinomas of the breast. *The Journal of Pathology* 215, 398–410.
- Marinho, V.F.Z., Sanches, F.S.F., Rezende, M.A., Andrade, V.P., Gobbi, H., 2007. Carcinoma micropapilar invasor da mama: aspectos anatomopatológicos, imuno-histoquímicos e evolutivos de um tipo histológico subdiagnosticado. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 43, 57.
- Middleton, L.P., Tressera, F., Sobel, M.E., Bryant, B.R., Albuquerque, A., Grases, P., Merino, M.J., 1999. Infiltrating micropapillary carcinoma of the breast. *Modern Pathology* 12, 499-504.
- Misdorp, W., Else, R.W., Hellmen, E., 1999. *Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat*. World Health Organization, Geneva.
- Nassar, H., Pansare, V., Zhang, H., Che, M., Sakr, W., Ali-Fehmi, R., Grignon, D., Sarkar, F., Cheng, J., Adsay, V., 2004. Pathogenesis of invasive micropapillary carcinoma: role of MUC1 glycoprotein. *Modern Pathology* 17, 1045–1050.

Owen, L. N., 1980. TNM Classification of tumors in Domestic Animals, First Ed. World Health Organization, Geneva, 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.

Pettinato, G., Manivel, C.J., Panico, L., Sparano, L., Petrella, G., 2004. Invasive micropapillary carcinoma of the breast: clinicopathologic study of 62 cases of a poorly recognized variant with highly aggressive behavior. *American Journal of Clinical Pathology* 121, 857-866.

Schippinger, W., Dandachi, N., Regitnig, P., Hofmann, G., Balic, M., Neumann, R., Samonigg, H., Bauernhofer, T., 2007. The Predictive Value of EGFR and HER-2/neu in Tumor Tissue and Serum for Response to Anthracycline-Based Neoadjuvant Chemotherapy of Breast Cancer. *American Journal of Clinical Pathology* 128, 630-637.

Siriaunkgul, S., Tavassoli, F.A., 1993. Invasive micropapillary carcinoma of the breast. *Modern Pathology* 6, 660-662.

Tavassoli, F.A., Devillee, P., 2003. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs, World Health Organization, Lyon, pp. 35-36.

The Consensus Conference Committee, 1997. Consensus Conference on the classification of ductal carcinoma in situ. *Cancer* 80, 1798-1802.

Walsh, M.M., Bleiweiss, I.R.A.J., 2001. Invasive Micropapillary Carcinoma of the Breast: Eighty Cases of an Underrecognized Entity. *Human Pathology* 32, 583-589.

Weigelt, B., Horlings, H.M., Kreike, B., Hayes, M.M., Hauptmann, M., Wessels, L.F., de Jong, D., Van de Vijver, M.J., Van't Veer, L.J., Peterse, J.L., 2008. Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *Journal Pathology* 216, 141–150.

Wolff, A.C., Hammond, M.E., Schwartz, J.N. Hagerty, K.L., Allred, D.C., Cote, R.J., Mitchell, D., Fitzgibbons, P.L., Hanna, W.M., Langer, A., McShane, L.M., Paik S., Pegram, M.D., Perez, E.A., Press, M.F., Rhodes, A., Sturgeon, C., Taube, S.E., Tubbs, R., Vance, G.H., van de Vijver, M., Wheeler, T.M., Hayes, D., 2007 American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 25, 118-145.

Yamaguchi, R., Tanaka, M., Kondo, K., Yokoyama, Y., Kaneko, Y., Yamaguchi, M., Ogata, Y., Nakashima, O., Kage, M., Yano, H., 2010. Characteristic Morphology of Invasive Micropapillary Carcinoma of the Breast: An Immunohistochemical Analysis. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 40, 781-787.

Zekioglu, O., Erhan, Y., Iris, M.C., Bayramoglu, H., Zdemir, N.O., 2004 Invasive micropapillary carcinoma of the breast: high incidence of lymph node metastasis with extranodal extension and its immunohistochemical profile compared with invasive ductal carcinoma. *Histopathology* 44, 18–23.

Table 1**Immunohistochemical reagents and methods used**

Target antigen	Clone	Manufacturer	Dilution	AR method (T°)	Incubation time (h)
ER	1D5	Dako	1:20	Pressurised Heating (125 °C)	1
PR	HPRA2	Neomarkers	1:20	Pressurised Heating (125 °C)	1
EMA	E29	Dako	1:25	Water bath (98 °C)	16
Ki-67	Mib-1	Dako	1:25	Pressurised Heating (125 °C)	1
p63	4a4	Neomarkers	1:100	Water bath (98 °C)	16
Cytokeratin	AE1AE3	Dako	1:100	Water bath (98 °C)	1
CD-31	JC70A	Dako	1:20	Water bath (98 °C)	16
Cytokeratin	34βE12	Dako	1:50	Water bath (98 °C)	1
EGFR	31G7	Zymed	1:100	Water bath (98 °C)	16
C-erb B2	Polyclonal	Dako	1:200	Water bath (98 °C)	16

AR, Antigen Retrieval; ER, Oestrogen Receptor; PR, Progesterone Receptor; EMA,

Epithelial Membrane Antigen; EGFR, Epithelial Growth Factor Receptor.

Table 2**Clinicopathological features of pure canine mammary IMPCa compared with mixed IMPCa**

	Pure IMPCa (n=15)	Mixed IMPCa (n=7)
Mean age (years) (n=21)	11.4 ± 1.8	9.8±1.2
Median tumour size (cm; maximum - minimum) (n=19)	5.11 (10 – 0.5)	7.5 (13 – 4)
Breed (n[%])(n=20)		
Crossbreed	3(21.4)	3(50)
Cocker	3(21.4)	0(0)
Poodle	2 (14.3)	1(16.7)
Other breeds ^a	6 (42.9)	2 (33.3)
Cutaneous ulceration		
Absent	3 (20)	2 (28.6)
Present	12 (80)	5 (71.4)
Histological grade (n [%])		
I	5(33.3)	1(14.3)
II	7(46.7)	6(85.7)
III	3(20)	0(0)
Stage (TNM; n [%]) (n = 6)		
I	0 (0)	0 (0)
II	0 (0)	0 (0)
III	0 (0)	0 (0)
IV	4 (100)	2 (100)
V	0 (0)	0 (0)
<i>In situ</i> micropapillary carcinoma		
Absent	7(46.7)	1 (14.3)
Present	8(53.3)	6(85.7)
Vessel invasion (n [%])		
Absent	4 (26.7)	0(0)
Present	11(73.3)	7(100)
Lymph node metastasis (n=17)		
Absent	0(0)	0(0)
Present	12(100)	5(100)
Distant Metastasis (n=9)		
Absent	4 (80)	3(75)
Present	1 (20)	1(25)

^aBreeds presenting with only one case each: Bichon Frise, Dachshund, Dalmatian, Doberman, Siberian Husky, Akita, Pinscher and Labrador Retriever.

Table 3**Immunohistochemical analysis of HER-2, EGFR, ER, PR, CKAE1AE3, CK34βE12, p63 and EMA in canine IMPCa**

Antibodies	Number of canines (%)			
	0	+	++	+++
ER ^a	1/20 (5)	19/20 (95)	NA	NA
PR ^a	1/20 (5)	19/20 (95)	NA	NA
HER-2 ^b	8/22 (36.4)	8/22 (36.4)	3/22 (13.6)	3/22 (13.6)
EGFR ^b	1/22 (4.6)	14/22 (63.6)	3/22 (13.6)	4/22 (18.2)
P63 ^c	16/20 (80)	4/20 (20)	NA	NA
CK34βE12 ^d	2/22 (9.1)	20/22 (90.9)	NA	NA
CKAE1AE3 ^e	0/22 (0)	22/22 (100)	NA	NA
EMA ^f	0/22 (0)	22/22 (100)	NA	NA

ER, Oestrogen Receptor; PR, Progesterone Receptor; EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor; CK, Cytokeratin; EMA, Epithelial Membrane Antigen; NA, Not Applied.

^a0 < 1% nuclear staining of tumour cells; + > 1% nuclear staining of tumour cells

^b0 No staining; + weak, incomplete membrane staining of any proportion of the tumour cells; ++ complete membrane staining that is either non-uniform or weak in intensity but with obvious circumferential distribution in at least 10% of cells, or intense, complete membrane staining of 30% or fewer tumour cells; +++ uniform, intense membrane staining of > 30% of tumour cells

^c0 No staining; + nuclear-positive p63 protein staining in epithelial cell nests localised within cystic spaces

^d0 No staining; + strong immunoreactivity, regardless of the extent, and moderate-to-weak expression in more than 10% of the total tumour area

^e0 No staining; + cytoplasmic staining in epithelial cells

^f0 No staining; + positive staining on the stromal-facing surface of the cell clusters, which accentuates the outline of the micropapillary units by forming a distinct band on this surface

Figure Legends

Fig. 1 Invasive micropapillary carcinomas of the canine mammary gland. a. Invasive micropapillary areas characterised by neoplastic epithelial cells within cystic spaces (arrow). HE, Bar: 90 μm ; b. Moderately pleomorphic neoplastic epithelial cells within cystic spaces. HE, Bar: 20 μm ; c. *In situ* micropapillary carcinoma. HE, Bar: 50 μm ; d. Lymph node metastasis exhibited the same arrangement found in the primary tumour (arrow). HE, Bar: 50 μm .

Fig. 2 Invasive micropapillary carcinomas of the canine mammary gland. a. Micropapillae externally covered by a line of EMA (arrow). Streptavidin–biotin–peroxidase anti-EMA, counterstained with Harris's hematoxylin. Bar: 20 μm ; b. Staining for CD-31 was negative in the cystic spaces of the invasive micropapillary areas (arrow). Blood vessels were positive for CD-31 (asterisk). Streptavidin–biotin–peroxidase anti-CD-31, counterstained with Harris's hematoxylin. Bar: 20 μm ; c. Neoplastic epithelial cells showing CK34 β E12-positive staining in the cytoplasm (arrow). Streptavidin–biotin–peroxidase anti-CK34 β E12, counterstained with Harris's hematoxylin. Bar: 20 μm ; d. Staining for p63 was negative in the cystic spaces of the invasive micropapillary areas. Streptavidin–biotin–peroxidase anti-p63, counterstained with Harris's hematoxylin. Bar: 50 μm .

Fig. 3 Invasive micropapillary carcinomas of the canine mammary gland. a. Neoplastic ER-immunoreactive epithelial cells stained in brown (nuclei) (arrows). Streptavidin–biotin–peroxidase anti-ER, counterstained with Harris's hematoxylin. Bar: 30 μm ; b. Neoplastic PR-immunoreactive epithelial cells stained in brown (nuclei) (arrow). Streptavidin–biotin–peroxidase anti-PR, counterstained with Harris's hematoxylin. Bar: 50 μm .

Figure 1

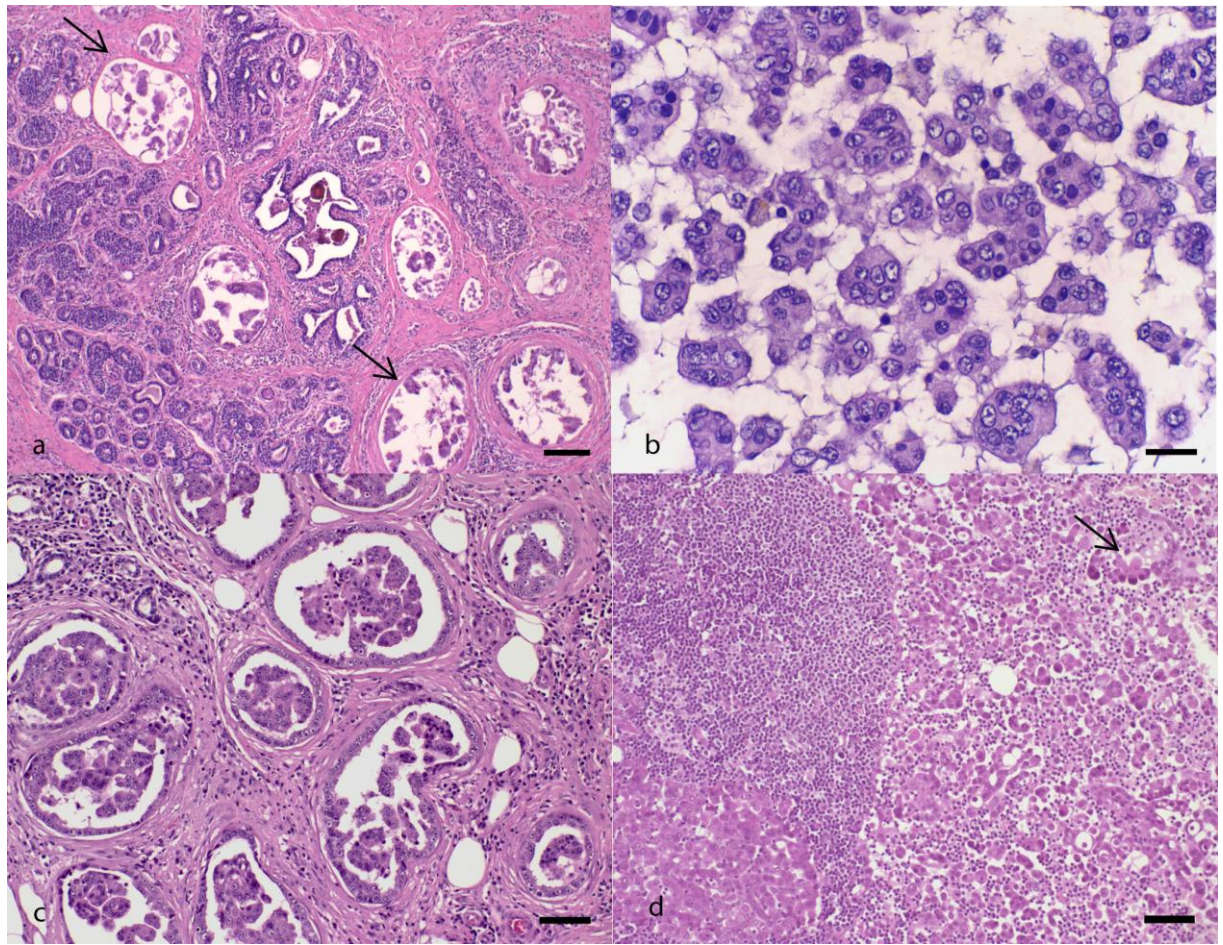


Figure 2

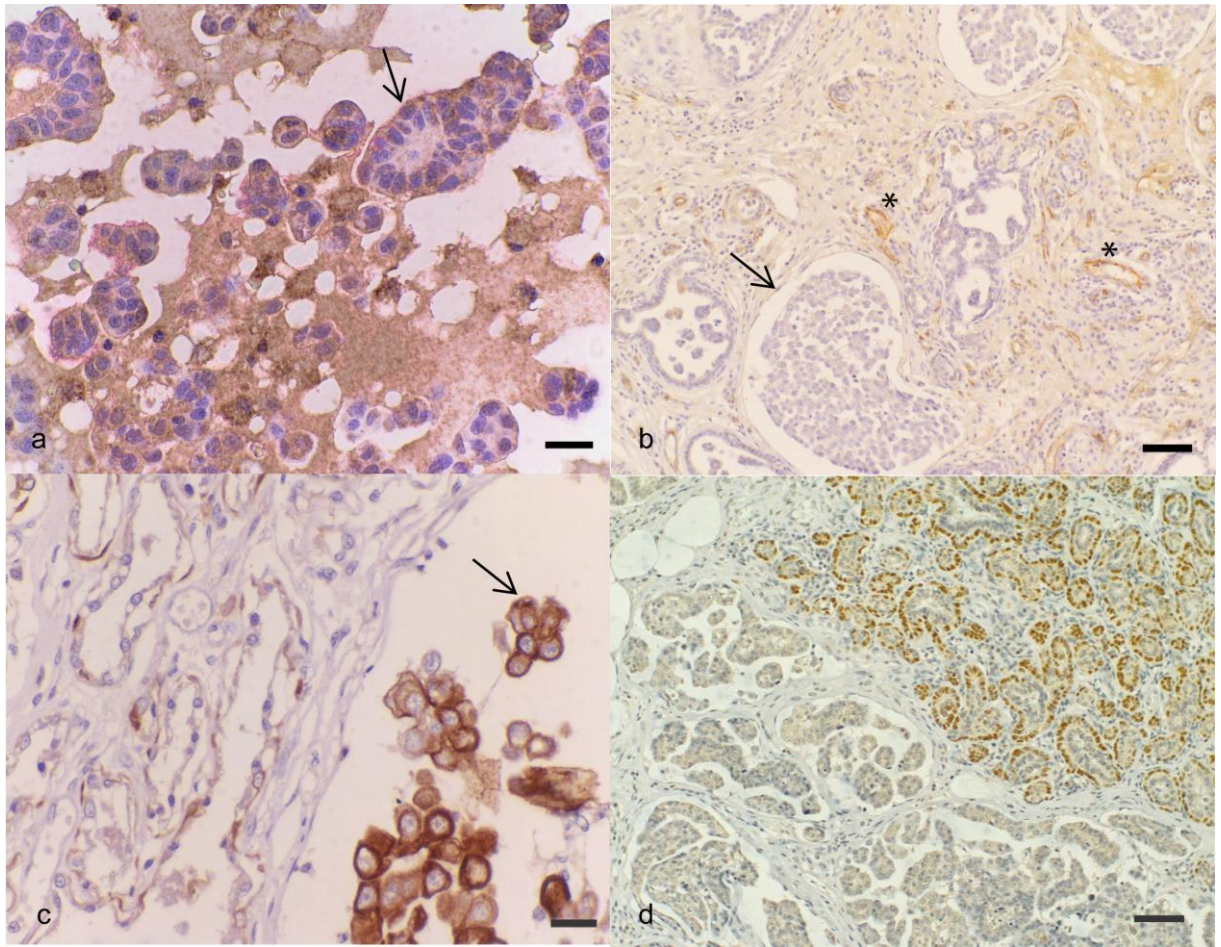
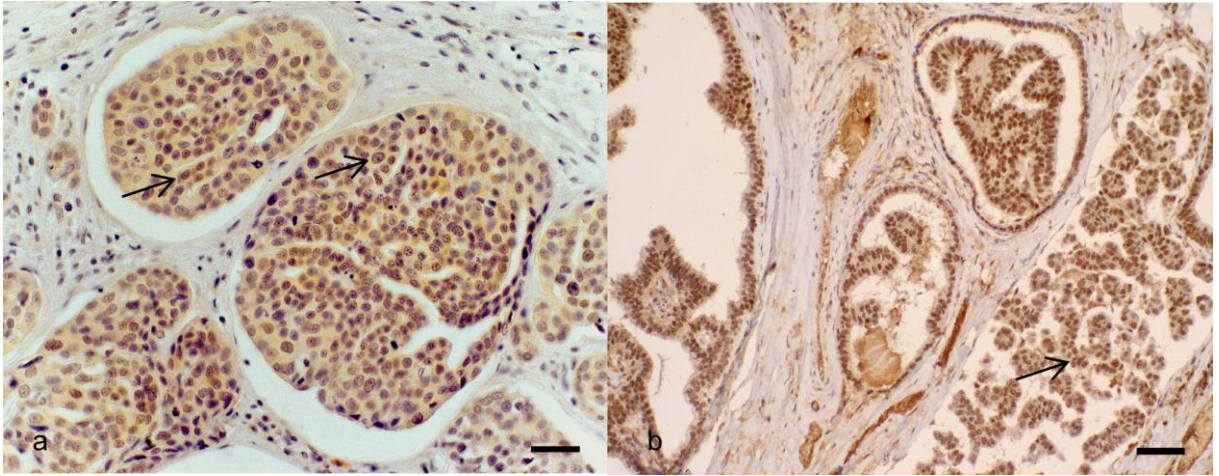


Figure 3



8 CONCLUSÕES FINAIS

A partir das condições e dos dados obtidos nesta pesquisa pode-se concluir que:

- Histologicamente os CMI geralmente apresentam subtipo puro, possuem grau histológico intermediário (grau II) e frequentemente estão associados a carcinomas micropapilares *in situ* de grau nuclear intermediário e invasão vascular periférica,
- Os carcinomas micropapilares caninos são neoplasias que podem apresentar altas taxas de metástase para linfonodos regionais e estadio IV,
- Cadelas portadoras de subtipos puros e mistos de CMI apresentam sobrevida global de 120 e 180 dias, respectivamente,
- Os CMI caracterizam-se por índice de proliferação celular elevado, positividade para receptores hormonais (RE e RP) e CK34βE12, além de negatividade para receptores de fator de crescimento (HER-2 e EGFR).

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os CMI mamários humanos são considerados uma importante entidade neoplásica da glândula mamária, visto que possuem comportamento biológico extremamente agressivo. Em caninos o CMI é recente e apenas dois relatos de caso e uma comunicação breve foram apresentados até a execução do presente estudo. Após avaliação de 22 casos de CMI caninos é visível a importância clínica desta entidade na espécie, visto que independente do tamanho tumoral ela está associada com invasão linfática massiva, altas taxas de metástase para linfonodos regionais e sobrevida global curta. Diante disso, atenção especial deveria ser dada para caninos portadores deste carcinoma, assim como é feito com outras neoplasias mamárias extremamente agressivas, metastatizantes e de prognóstico desfavorável.

Adicionalmente, diante deste comportamento agressivo os CMI caninos podem ser considerados um excelente modelo espontâneo para estudos relacionados com os eventos responsáveis pelo comportamento invasivo e metastatizante de neoplasias mamárias malignas como a Transição Epitelial-Mesenquimal (TEM).

A TEM é um processo reversível que possui uma série de etapas que culminam com a perda de adesão entre células epiteliais (perda de expressão de E-caderina), a aquisição de fenótipo

mesenquimal (expressão de marcadores mesenquimais como: vimentina, N-caderina), e o aumento de motilidade celular e de invasividade (GREGORY *et al.*, 2008). Neste fenômeno a perda da expressão de E-caderina se dá em decorrência de alterações em seu promotor por silenciamento epigenético através de hipermetilação e/ou repressão transcricional mediada por fatores de transcrição: Snail1, TWIST1, ZEB1 e ZEB2 (BARANWAL; ALAHARI, 2009; COWIN *et al.*, 2005;). Estudos *in vitro* com linhagens de células metastatizantes tem comprovado a regulação da expressão destes fatores de transcrição por uma grande classe de pequenos RNAs não codificantes (18-24 nucleotídeos) chamados microRNAs (WRIGHT *et al.*, 2010). Exercendo o controle destes fatores de transcrição estas moléculas agem como reguladoras da TEM. Além disso, os microRNAs também podem ter papel estimulador da TEM (LORIO *et al.*, 2005; YAN *et al.*, 2008;).

Recentemente alteração relacionada com a TEM como expressão de N-caderina foi relatada em CMI humanos gerando uma possível ligação entre o comportamento agressivo metastatizante da neoplasia e a TEM (NAGI *et al.*, 2005). Diante desta hipótese, estudos imuno-histoquímicos e gênicos da expressão de moléculas envolvidas com a TEM como caderinas (E-caderina e N-caderina), vimentina, fatores de transcrição (Snail1, TWIST1, ZEB1 e ZEB2) e microRNAs deveriam ser conduzidos em CMI caninos.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARANWAL, S.; ALAHARI, S. K. Molecular mechanisms controlling E-cadherin expression in breast cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 384, n. 1, p. 6–11, 2009.

BARNARD N. J. *et al.*, Proliferative index in breast carcinoma determined in situ by Ki-67 immunostaining and its relationship to clinical and pathological variables. *J Pathol.*, v. 152, n. 4, p. 287–295, 1987.

BENJAMIN, S. A.; LEE, A. C.; SAUNDERS, W. J. Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles. *Vet. Pathol.*, v. 36, n. 5, p. 423–36, 1999.

BERTAGNOLLI, A. C. *et al.* Immunohistochemical Expression of p63 and Δ Np63 in Mixed Tumors of Canine Mammary Glands and Its Relation with p53 Expression. *Vet. Pathol.*, v.46, n.3, p.407-415, 2009.

BERTAGNOLLI, A. C. *et al.* Canine mammary mixed tumours: immunohistochemical expressions of EGFR and HER-2. *Aust. Vet. J.*, v.89, n.8, p.312-317, 2011.

BRODY, R. S.; GOLDSCHMIDT, M. H.; ROSZEL J. R. Canine mammary gland neoplasms. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, v.19, p.61-69, 1983.

CASSALI, G. D. *et al.*. Cytological diagnosis of a metastatic canine mammary tumor in pleural effusion. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 51, n. 4, p. 307- 310, 1999a.

CASSALI, G. D. *et al.* Secretory carcinoma of the canine mammary gland. *Vet. Pathol.*, v. 36, n. 6, p. 601-603, 1999b.

CASSALI, G. D. *et al.* Invasive micropapillary carcinoma of the dog mammary gland. A case report. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 24, n. 4, p.366–369, 2002a.

CASSALI, G. D.; GARTNER, F.; SCHMITT, F.C. Pleomorphic lobular carcinoma of the canine mammary gland: histopathologic and immunohistochemical features. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.54, n.6, 2002b.

CASSALI, G. D. *et al.* Mammary gland diagnosis of the laboratory of comparative pathology. *Clínica Veterinária – supplement XIV year, Proceedings WSAVA*, p. 173, 2009.

CASSALI, G. D. *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.

CHEN, L. *et al.* Breast carcinoma with micropapillary features: clinicopathologic study and long-term follow-up of 100 cases. *Int. J. Surg. Pathol.*, v. 16; n. 2, p. 155-163, 2008.

COWIN, P.; ROWLANDS, T. M.; HATSELL, S. J. Cadherins and catenins in breast cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.*, v. 17, n. 5, p. 499–508, 2005.

DE LA CRUZ, C. *et al.* Invasive micropapillary carcinoma of the breast: clinicopathological and immunohistochemical study. *Pathol. Int.*, v. 54, n. 2, p. 90–96, 2004.

DOBSON, J. M. *et al.*: Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *J. Small. Anim. Pract.*, v.43, n. 6, p. 240-246, 2002.

DORN, C. R. *et al.* Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *J. Natl. Cancer Inst.*; v. 40, n. 2, p.307–18, 1968.

DUTRA, A. P. *et al.* cerbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 37, n. 11 , p.673–681, 2004.

DUTRA, A. P. *et al.* 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.

EGENVALL, A. *et al.* Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Prev. Vet. Med.*, v. 69, n. 1-2, p. 109-127, 2005.

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.

ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Assessment of histological grade. In: ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. *The breast*, Third Ed. London: Churchill Livingstone, 1998. vol. 13, cap. 17, p. 365-384.

ESTEVA, F. J; HORTOBAGYI, G. N. Prognostic molecular markers in early breast cancer. *Breast Cancer Res.*, v.6, n. 3, p. 109-118, 2004.

FERREIRA E. *et al.* The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. *Vet. Comp. Oncol.*, v.193, n. 4, p. 1-6, 2009.

FIDLER, I. J.; BRODEY, R. S. A necropsy study of canine malignant mammary neoplasms. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 151, n. 6, p.710-5, 1967.

FOWLER, E. H.; WILSON, G. P.; KOESTER, A. Biologic behavior of canine mammary neoplasms based on a histogenic classification. *Vet. Pathol.*, v. 11, p. 212–29, 1974.

GAMA A. *et al.* Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in canine mammary tissues. *Res. Vet. Sci.*, v.87, n. 3, p. 432–437, 2009.

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.

GAMBA, C. O. *et al.* Tubulopapillary carcinoma of the mammary gland in a maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*): histopathological and immunophenotypical analysis. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.63, n.6, p.1377-1381, 2011a.

GAMBA, C. O. *et al.* Cystadenocarcinoma simulating hemangiosarcoma of the salivary gland in dog: case report. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 63, n. 3, p. 574-578, 2011b.

GERALDES, M.; GÄRTNER, F.; SCHMITT, F. Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours. *Vet. Rec.*, v. 146, n. 14, p. 403-406, 2000.

GERDES J. *et al.* Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J. Immunol.*, v. 133, n. 4, p. 1710–1715, 1984.

GERDES J. *et al.* Immunohistological detection of tumour growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin-fixed and routinely processed tissues. *J. Pathol.*, v. 168, n. 4, p. 85–87, 1992.

GILBERTSON, S. R. *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.

GOLDSCHMIDT, M. H.; SHOFER, F. S.; SMELSTOYS, J. A. Neoplastic lesions of the mammary gland. In: MOHR, U., (Ed.). Pathobiology of the aging dog. Ames, IA: Iowa State University Press, 2001. p. 168–78.

GOLDSCHMIDT, M. *et al.* Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet. Pathol.*, v. 48, n. 1, p. 117-131, 2011.

GOWN, A. M.; VOGEL, A. M. Monoclonal Antibodies to Human Intermediate Filament Proteins II. Distribution of Filament Proteins in Normal Human Tissue. *Am. J. Pathol.*, v. 114, n. 2, p. 309-321, 1984.

GREGORY, P. A. *et al.* MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition. *Cell Cycle*, v.7, n.20, p.3112-3118, 2008.

HAMMOND, M. E. *et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, v. 28, n. 16, p. 2784-2795, 2010.

HELLMEN, E.; BERGSTROM, R.; HOLMBERG, L. Prognostic factors in canine mammary gland tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. *Vet. Pathol.*, v. 30, n. 1, p. 20–7, 1993.

KARAYANNOPOULOU, M. *et al.* 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.

KURODA, H. *et al.* Clinical and pathologic features of invasive micropapillary carcinoma. *Breast Cancer*, v. 11, n. 2, p. 169-174, 2004.

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

LAS MULAS, M. *et al.* Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Breast Cancer Res Treat*, v. 80, n. 3, p. 363–367, 2003.

LAS MULAS, J.; MILLÁN, M. Y.; DIOS, R. A Prospective Analysis of Immunohistochemically Determined Estrogen Receptor and Progesterone Receptor Expression and Host and Tumor Factors as Predictors of Disease-free Period in Mammary Tumors of the Dog. *Vet. Pathol.*, v. 42, n. 2, p. 200-212, 2005.

LORIO, M. V. *et al.* MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.*, v.65, n. 16, p. 7065–70, 2005.

LUNA-MORÉ, S. *et al.* Invasive micropapillary carcinoma of the breast. A new special type of invasive mammary carcinoma. *Pathol. Res. Pract.*, v. 190, n. 7, p. 668-674, 1994.

- LUNA-MORE, S. *et al.* Estrogen and progesterone receptors, c-erbB-2, p53, and Bcl-2 in thirty-three invasive micropapillary breast carcinomas. *Pathol. Res. Pract.*, v. 192, n. 1, p. 27–32, 1996.
- LUNA-MORE, S. *et al.* Importance of estrogen receptors for the behavior of invasive micropapillary carcinoma of the breast. Review of 68 cases with follow-up of 54. *Pathol. Res. Pract.*, v.196, n. 1, p. 35–9, 2000.
- MARCHIÒ, C. *et al.* Genomic and immunophenotypical characterization of pure micropapillary carcinomas of the breast. *J. Pathol.*, v. 215, n. 4, p. 398–410, 2008.
- MARINHO, V. F. Z. *et al.* Carcinoma micropapilar invasor da mama: aspectos anatomopatológicos, imuno-histoquímicos e evolutivos de um tipo histológico subdiagnosticado. *Bras. Patol. Med. Lab.*, v.43, n. 5, p. 57, 2007.
- MCCARTY, K. S., Correlation of estrogen and progesterone receptors with histologic differentiation in mammary carcinoma. *Cancer*, v. 46, n. S12, p. 2851-2858, 1980.
- MERLO, D. F. Cancer Incidence in Pet Dogs: Findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 22, n. 4, p. 976-984, 2008.
- MIDDLETON, L. P. *et al.* Infiltrating micropapillary carcinoma of the breast. *Mod. Pathol.*, v. 12, p. 499-504, 1999.
- MILLIS, R.R. Correlation of hormone receptors with pathological features in human breast cancer. *Cancer*, v. 46, n. S12, p. 2869-2871, 1980.
- MISDORP, W.; ELSE, R. W.; HELLMEN, E. Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat. World Health Organization, Geneva, 1999.
- MISDORP, W. *et al.* Histological classification of mammary tumors of the dog and cat. WHO International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals. 2. Ed. Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, 2001.
- MOLL, R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* v. 31, n. 1, p. 11–24, 1982.
- MOULTON, J. E. Tumors of the mammary gland. In: Tumors in Domestic Animals, 3rd Edit., J.E. Moulton, Ed., University of California Press, Berkeley, p. 518-552, 1990.
- NAGI, C. *et al.* N-cadherin expression in breast cancer: correlation with an aggressive histologic variant – invasive micropapillary carcinoma. *Breast Cancer Res. Treat.*, v. 94, n. 3, p. 225–235, 2005.
- NASSAR, H. *et al.* Clinicopathologic analysis of invasive micropapillary differentiation in breast carcinoma. *Mod. Pathol.*, v. 14, n. 9, p. 836–841, 2001.

- NASSAR, H. *et al.* Pathogenesis of invasive micropapillary carcinoma: role of MUC1 glycoprotein. *Mod. Pathol.*, v. 17, p. 1045–1050, 2004a.
- NASSAR, H. Carcinomas with Micropapillary Morphology Clinical Significance and Current Concepts. *Adv. Anat. Pathol.*, v. 11, n. 6, p. 297-303, 2004b.
- NIETO, A. *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.
- OLIVEIRA FILHO, J. C., Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. *Pesq. Vet. Bras.* v. 30, n. 2, p. 177-185, 2010.
- OWEN, L. N., TNM Classification of tumors in Domestic Animals, First Ed. World Health Organization, Geneva, pp. 26–32, 1980.
- PATERAKOS, M. *et al.* Invasive micropapillary carcinoma of the breast: a prognostic study. *Hum. Pathol.*, v. 30, n. 12, p. 1459–1463, 1999.
- PEÑA, L. L. *et al.* Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. *J. Vet. Diag. Invest.*, v.10, n. 3, p.237-246, 1998.
- PETTINATO, G. *et al.* Invasive micropapillary carcinoma of the breast: clinicopathologic study of 62 cases of a poorly recognized variant with highly aggressive behavior. *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 121, p. 857-866, 2004.
- PHILIBERT, J. C. *et al.* Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 17, n. 1, p. 102-106, 2003.
- PRIESTER, W. A.; MANTEL, N. Occurrence of tumors in domestic animals. Data from 12 United States and Canadian colleges in veterinary medicine. *J. Natl. Cancer. Inst.*, v. 43, n. 6, p. 1333–44, 1971.
- REIS, L. *et al.* Immunohistochemical study of the expression of E-cadherin in canine mammary tumours. *Vet. Rec.*, v. 152, n. 20, p. 621-624, 2003.
- SHRESTHA, P. *et al.* Proliferative cell nuclear antigen in breast lesions: correlation of c-erbB-2 oncoprotein and EGF receptor and its clinicopathological significance in breast cancer. *Virchows. Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.*, v. 421, n. 3, p. 193–202, 1992.
- SIRIAUNKGUL, S.; TAVASSOLI, F. A. Invasive micropapillary carcinoma of the breast. *Mod. Pathol.*, v. 6, n. 6, p. 660-662, 1993.
- SLAMON, D.J. *et al.* Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, v. 235, p. 177–182, 1987.
- SORENMO K. Canine mammary gland tumors. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v. 33, n. 3, p. 573-596, 2003.

TAVASSOLI, F. A, DEVILLEE, P. (eds). Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. Lyon, France: World Health Organization, 2003. p. 35-36.

TRESSERRA F, *et al.* Invasive micropapillary carcinoma. Distinct features of a poorly recognized variant of breast carcinoma. *Eur. J. Gynae-col. Oncol.*, v. 20, n. 3, p. 205–8, 1999

THE CONSENSUS CONFERENCE COMMITTEE. Consensus Conference on the classification of ductal carcinoma *in situ*. *Cancer*, v. 80, n. 9, p. 1798-1802, 1997.

TSUTSUI, 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.

WALSH, M. M.; BLEIWEISS, I. R. A. J. Invasive Micropapillary Carcinoma of the Breast: Eighty Cases of an Underrecognized Entity. *Hum. Pathol.*, v.32, n. 6, p. 583-589, 2001.

WITHROW, S.J.; VAIL, D.M. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E. G. Small animal clinical oncology. 4.Ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2007. pp. 619-633.

WOLFF, A.C., *et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.*, v. 25, n. 1 , p. 118-145, 2007.

YAMAGAMI, T.; KOBAYASHI, T.; TAKAHASHI, K. Prognosis for canine malignant mammary tumors based on the TNM and histologic classification. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 58, n. 7, p. 1079–83, 1996.

YAN, L. X., *et al.* MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA*, v. 14, n. 11, p. 2348–60, 2008.

YAMAGUCHI, R. *et al.* 2010. Characteristic Morphology of Invasive Micropapillary Carcinoma of the Breast: An Immunohistochemical Analysis. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, v. 40, n. 8, p. 781-787.

YEH, I-T.; MIES, C. Application of Immunohistochemistry to Breast Lesions. *Arch. Pathol. Lab. Med.* v. 132, n. 3, p.349–358, 2008.

ZEKIOGLU, O. *et al.* Invasive micropapillary carcinoma of the breast: high incidence of lymph node metastasis with extranodal extension and its immunohistochemical profile compared with invasive ductal carcinoma. *Histopathology*, v. 44, n. 1, p. 18–23, 2004.

WRIGHT, J.A.; RICHER, J.K.; GOODALL, G.J. microRNAs and EMT in Mammary Cells and Breast Cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, v.15, n. 2, p.213–223, 2010.

11 APÊNDICES

APÊNDICE A – Produção científica relacionada à dissertação no período de março de 2010 a março de 2012

Resumos apresentados em congressos

XVIII Simpósio Mineiro de Oncologia e XVIII Encontro do Ex-residentes do CEOMG 6 a 9 de Abril 2011

- DIAS, E.J; GAMBA, C.O.; AULER, P.A.; FERREIRA, E.F.; CASSALI, G.D. Semelhança entre a Expressão Nuclear de p63 em Carcinomas Micropapilares Invasivos Humanos e Caninos. XIII Simpósio Mineiro de Oncologia e XVIII encontro de ex-residentes da CEOMG 2011

XXVIII Congresso Brasileiro de Patologia e Congresso de la Sociedad Latinoamericana de Patologia 2011

- GAMBA, C.O.; DIAS, E.J.; ESTRELA-LIMA, A.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, E.; CASSALI, G.D. Carcinoma micropapilar invasivo da glândula mamária canina: análise clínico-patológica e determinação de sobrevida global, 2011, Belo Horizonte.

APÊNDICE B - Produção científica não relacionada à dissertação no período de março de 2010 a março de 2012

Resumos apresentados em congressos

XVIII Simpósio Mineiro de Oncologia e XVIII Encontro dos ex-residentes do CEOMG 6 a 9 de Abril 2011

- RABELO, B.; DAMASCENO, K.; GAMBA, C.O.; CAMPOS, C.B.; CASSALI, G.D. carcinoma ductal/lobula misto: modelo animal. In: XVIII Simpósio Mineiro de Oncologia e XVIII encontro de ex-residentes da CEOMG, 2011, Belo Horizonte.

VI ONCOVET e III Simpósio de Oncologia 29 Abril a 2 de Maio 2010

-GAMBA, C.O.; FERREIRA, E.; GOBBI, H.; CASSALI, G.D. Premalignant mammary lesions: expression patterns of prognostic markers in canine mammary ductal hyperplasia. In: VI ONCOVET e III Simpósio de Oncologia, 2010, Belo Horizonte.

- GAMBA, C.O.; SOUZA, C.M.; FERREIRA, E.; FERREIRA, M.A.; PESQUEIRO, J.L.; CASSALI, G.D. KINT3-4 protein from human plasminogen delays ehrlich tumor growth in mice. In: VI ONCOVET e III Simpósio de Oncologia, 2010, Belo Horizonte.

XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária 26 a 30 de Setembro 2011

- GAMBA, C.O.; SILVA, J.O.; CAMPOS, L.C.; BERNARDES, V.F.; DAMASCENO, K.A.; SOUZA, C.M.; CASSALI, G.D. Tumor estromal gastrintestinal canino: relato de caso com ênfase em diagnóstico diferencial; In: XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária, 2011. Goiânia.

- CAMPOS, C.B.; DAMASCENO, K.A.; GAMBA, C.O.; SOUZA, C.M.; CAPOS, L.C.; ESTRELA-LIMA, A.; FERREIRA, E.; CASSALI, G.D. Estudo imuno-histoquímico da expressão de e-caderina e sua relação com sobrevida global em tumores mamários caninos. In: XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária, 2011. Goiânia.

- SOUZA, C.M.; GAMBA, C.O.; DAMASCENO; SILVA A.C.A.; LOPES, M.T.P.; FERREIRA, M.A.N.D.; CASSALI, G.D. Caracterização morfológica do carcinoma mamário murino 4t1. . In: XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária, 2011. Goiânia.

- 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 histomorfologica e imunofenotípica de adenocarcinoma papilar de seio nasal: relato de caso. . In: XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária, 2011. Goiânia.

- DAMASCENO, K.A.; SALGADO, B.R.; GAMBA, C.O.; SOUZA, C.M.; CAMPOS, L.C.; CAMPOS, C.B.; CASSALI, G.D. Análise histoquímica e imunofenotípica de adenocarcinoma retal mucinoso em cão: relato de caso. In: XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária, 2011. Goiânia.

- AULER, P.A.; GAMBA, C.O.; DAMASCENO, K.A.; LAVALLE, G.E.; CASSALI, G.D. Carcinoma de células escamosas em prepúcio de cão com metástase para linfonodo regional: Relato de caso. In: XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária, 2011. Goiânia.

- OLIVEIRA, N.S.C; SILVA,I.L.D; GAMBA, C.O.; CASSALI, G.D.; VARASQUIM, M.S.; FERREIRA, E. Expressão de EGFR e HER-2 em carcinomas in situ da glândula mamária canina. . In: XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária, 2011. Goiânia.
- DAMASCENO, K.A.; GAMBA, C.O.; RIBEIRO, L.G.R; ESTRELA-LIMA, A.; FERREIRA, E.; CASSALI, G.D. Análise histomorfológica e imunofenotípica de hiperplasia de células colunares associada a carcinoma cribriforme na glândula mamária felina: estudo de caso. . In: XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária, 2011. Goiânia.
- BERTAGNOLLI, A.C.; ROCHA, R.M.; DAMASCENO, K.A.; GAMBA, C.O.; DIAS, E.J.; PRIMO, J.; CASSALI, G.D. progressão maligna dos tumores mistos benignos mamários da cadela: um estudo imuno-histoquímico empregando a tecnologia dos microarranjos de tecidos. . In: XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária, 2011. Goiânia.
- SOUZA, C.M.; VIEIRA, T.S.; DAMASCENO, K.A.; GAMBA, C.O.; CAMPOS, L.C.; CAMPOS, C.B.; AULER, P.A.; CASSALI, G.D. Tumor misto de glândula sudorípara em cão- relato de caso. In: XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária, 2011. Goiânia.
- VIERA, A.L.S; COSTA, A.M.; DAMASCENO, K.A.; GAMBA, K.A.; CASSALI,G.D.; SANTOS, R.L.; PAIXÃO, T.A. Carcinoma papilar ovariano em onça (*PANTHERA ONCA*). In: XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária, 2011. Goiânia.

Artigos publicados em periódicos

- CAMPOS, L. C. ; GAMBA, C.O. ; LAVALLE, G.E. ; CASSALI,G.D. . CEA como marcador tumoral em cadela portadora de carcinossarcoma mamário avançado. Revista Científica de Medicina Veterinária. Pequenos Animais e Animais de Estimação- *MEDVEP*, v. 8, n.27, Curitiba: Medveo, p.646- 649, 2010.
- GAMBA, C.O.; DAMASCENO, K.A.; CAMPOS, C.B.;FERREIRA, E.; CASSALI, G.D. Cystadenocarcinoma simulating hemangiosarcoma of the salivary gland in dog: case report. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.63, n.3, p.574-578, 2011.
- CASSALI 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.
- SOUZA, C.M.; DAMASCENO, C.A.; GAMBA, C.O.; CAMPOS, L.C.; CAMPOS, C.B.;CASSALI, G.D. Tumor misto de glândula sudorípara canina. *Acta Scientiae Veterinariae*. V.39, n.4, p. 1001, 2011.

-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. *Vet Quarterly*, v.31, n.4, p.1-4, 2011.

-GAMBA, C.O.; DAMASCENO, K.A., MALTA, M.C.C; FERREIRA, E.; CASSALI, G.D. Tubulopapillary carcinoma of the mammary gland in a maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*): histopathological and immunophenotypical analysis. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.63, n.6, p.1377, 1381, 2011.

12 ANEXOS

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



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

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 211/2009**, relativo ao projeto intitulado "**Determinação dos fatores prognósticos em carcinomas micropilares da glândula mamária canina**", 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 **9/ 12/2009**.

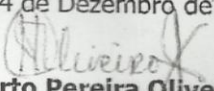
Este certificado expira-se em **9/ 12/ 2014**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 211/2009**, related to the project entitled "**Determination of prognostic factors in micropapillary carcinomas of the canine mammary gland**", 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 **December 9, 2009**.

This certificate expires in **December 9, 2014**.

Belo Horizonte, 14 de Dezembro de 2009.


Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

ANEXO B - Sistema TNM de estadiamento clínico

T tumor primário

T1 <3cm

T2 3-5cm

T3 >5cm

N status de linfonodos regionais

N0 sem metástase

N1 com metástase

M Metástase à distância

M0 com metástase

M1 sem metástase

Estadios

I T1 N0 M0

II T2 N0 M0

III T3 N0 M0

IV T123 N1 M0

V T123 N01 M1

FONTE: OWEN (1980)

ANEXO C - Graduação histológica de neoplasias mamárias caninas.

Características	Escore
Formação tubular	
>75%	1
10-75%	2
<10	3
Pleomorfismo nuclear	
Células pequenas, uniformes e regulares	1
Aumento moderado de tamanho	2
Variação acentuada	3
Índice mitótico*	
0-7	1
8-16	2
>17	3

Escore total**	
I	3-5
II	6-7
III	8-9

FONTE: Elston e Ellis (1991)

*Mitoses/10 campos em aumento de 40x em microscópio Olympus BX 40 (diâmetro do campo 0,55mm e áreas do campo 0,239)

**Soma da pontuação de formação tubular, pleomorfismo nuclear e índice mitótico.

ANEXO D - Comprovação da submissão de artigo científico para a revista The Veterinary Journal

Caixa de Entrada [Desconectar](#)
[SquirrelMail](#)

[Escrever](#) [Pastas](#) [Procurar](#) [Opções](#)

[Resultados da busca](#) [Excluir](#) [Encaminhar](#) [Encaminhar como anexo](#) [Responder](#) [Responder a todos](#)

Assunto: Submission Confirmation for The Veterinary Journal
De: "TVJL" <TVJL@elsevier.com>
Data: Seg, Novembro 28, 2011 7:12 pm
Para: cassalig@icb.ufmg.br
Prioridade: Normal
Opções: [Ver cabeçalho completo](#) | [Ver Versão para Impressão](#) | [Baixar como um arquivo](#)

Title: The diagnostic importance of invasive micropapillary carcinoma in the canine mammary gland: clinicopathological, immunohistochemical and survival analysis

Dear Prof. Cassali,

Your submission has been received by the journal
The Veterinary Journal.

You will be able to check on the progress of your paper by logging onto the Elsevier Editorial Systems as an Author using the following information:

<http://ees.elsevier.com/ytvj1/>
Username: Your username is: GCassali
If you can't remember your password please click the "Send Password" link on the Login page.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Editorial Office Staff
The Veterinary Journal

For further assistance, please visit our customer support site at
<http://support.elsevier.com>
Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

ANEXO E - Comprovação da solicitação de revisão de artigo científico emitida pela revista
The Veterinary Journal

----- Mensagem Original -----
Assunto: YTVJL-D-11-01051 Revision Requested
De: "TVJL" <TVJL@elsevier.com>
Data: Qua, Janeiro 4, 2012 7:33 pm
Para: cassalig@icb.ufmg.br
CC: joseph.cassidy@ucd.ie

Ms. No. YTVJL-D-11-01051
The diagnostic importance of invasive micropapillary carcinoma in the canine
mammary gland: clinicopathological, immunohistochemical and survival analysis
The Veterinary Journal

Dear Prof. Cassali,

I enclose the reports of the referees on your manuscript. The manuscript will be reconsidered for publication after revision. Please note carefully the comments of your editor, Dr Cassidy, below.

IMPORTANT: Your article may have been edited by the Editor handling your paper. If so, the Word document title will include the word 'edited'. You **MUST ONLY** use this version in preparing your revised text. You should click on download submission files link from your author menu on EES and ensure you are making changes to the most up to date version of the manuscript.

The comments listed below must be taken into account when revising the manuscript. Along with your revision, you will need to supply a response letter ('Revision Note'), which is a thorough, detailed point by point response to each of the Reviewer's concerns, specifically noting each comment made by the Reviewers and/or Editor, and describing all changes. Should you disagree with any comment(s), please explain why.

Please submit your revision online by logging onto the Elsevier Editorial System for The Veterinary Journal using the following combination:
<http://ees.elsevier.com/ytvj/>

Your username is: Your username is: GCassali
If you can't remember your password please click the "Send Password" link on the Login page.

You will find your submission record under the menu item, 'Submissions Needing Revision'.

When submitting your revised manuscript, please ensure that you upload the source files (e.g. Word). Uploading only a PDF file at this stage will create delays should your manuscript be finally accepted for publication. If your revised submission does not include the source files, we will contact you to request them.

We are looking forward to receiving the revised submission. If you do not intend to resubmit, please advise me as soon as possible.

Kind regards,

Dr Andrew Higgins BVetMed MSc PhD FSB MRCVS
Editor-in-Chief
The Veterinary Journal

Editorial Office Web Portal: www.ees.elsevier.com/ytvj1
For guidelines on how to submit your revised manuscript please go the following address: http://support.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/91

**ANEXO F - Comprovação de re-submissão de artigo referente à dissertação para a revista
The Veterinary Journal**

Elsevier Editorial System(tm) for The Veterinary Journal
Manuscript Draft

Manuscript Number: YTVJL-D-11-01051R1

Title: Histology and immunohistochemistry of invasive micropapillary carcinoma of the canine mammary gland, a retrospective study

Article Type: Original Article

Keywords: Invasive micropapillary carcinoma; Mammary gland; Dog; Immunohistochemistry

Corresponding Author: Prof. Geovanni D Cassali, PhD

Corresponding Author's Institution: UFMG

First Author: Conrado O Gamba, DVM

Order of Authors: Conrado O Gamba, DVM; Everton J Dias, Academic; Lorena R Ribeiro, DVM; Liliane C Campos, MSc; Alessandra Estrela-Lima, PhD; Enio Ferreira, PhD; Geovanni D Cassali, PhD

Abstract: Invasive micropapillary carcinoma (IMPCa) of the mammary gland, despite its rare occurrence in humans and dogs, is an important neoplasm due to its aggressive behaviour. The aim of this study was to evaluate the clinicopathological and immunophenotypical characteristics of IMPCa and to determine the overall survival of canines with IMPCa. Of the 22 cases of IMPCa selected for analysis, the majority had > 3 cm neoplasms (15/19, 78.95%) and lymph node metastases (16/16, 100%). Only two cases (2/9, 22.2%) had distant metastases. Histopathology revealed nests of epithelial neoplastic cells localised within empty spaces that lacked a fibrovascular core. IMPCas were classified as either pure (15/22, 68.18%) or mixed (7/22, 31.82%) types. A predominance of moderate histological grade (16 grade II) IMPCa was observed. The average overall survival was 120 days. Positive immunohistochemical staining for Epithelial Membrane Antigen (EMA) and negative staining for CD-31, p63 and cytokeratin (CK) AE1/AE3 in cystic formations confirmed the micropapillary nature of the IMPCa. Some cases showed positive epithelial staining for p63 (4/20, 20%) and CK34 β E12 (20/22, 90.9%). Most cases were positive for Oestrogen Receptor (ER) (19/20, 95%) and Progesterone Receptor (PR) (19/20, 95%) but lacked HER-2 (16/22, 72.72%) and Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) (15/22, 68.18%) overexpression. The mean proliferation index was 14.8%. These findings demonstrate that, similar to human IMPCas, canine IMPCas have aggressive behaviour with high rates of metastasis to regional lymph nodes and short overall survival. Therefore, IMPCas may be considered important lesions of the mammary gland in canines.