

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**ASSOCIAÇÕES DO ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO E DE APOPTOSE
CELULAR COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS,
EPIDEMIOLÓGICAS E HISTOPATOLÓGICAS DO CÂNCER
MAMÁRIO DE CADELAS SEM RAÇA DEFINIDA**

CAIO HENRIQUE PAGANINI BURINI

**BOTUCATU - SP
Julho 2007**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**ASSOCIAÇÕES DO ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO E DE APOPTOSE
CELULAR COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS,
EPIDEMIOLÓGICAS E HISTOPATOLÓGICAS DO CÂNCER
MAMÁRIO DE CADELAS SEM RAÇA DEFINIDA**

CAIO HENRIQUE PAGANINI BURINI

**Tese apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção
do título de Doutor**

Orientador: Prof. Dr. Enio Pedone Bandarra

Co-Orientadora: Prof. Ass. Dra. Renée Laufer Amorim

**BOTUCATU - SP
Julho 2007**

Banca examinadora:

Prof^a. Ass. Dra. Renée Laufer Amorim

Prof^a. Dra. Maria Denise Lopes

Prof. Ass. Dr. Luiz Henrique do Araujo Machado

Prof. Dr. Paulo César Maiorka

Prof. Dr. Andrigo Barbosa de Nardi

Botucatu, 10 de julho de 2007

Ào meu Pai **Roberto Carlos Burini** e minha mãe **Nádia Lúcia Paganini Burini**, que sempre estiveram ao meu lado, pelo incentivo, amor e compreensão.

Aos meus irmãos **Paulo, Franz e Lissandra** pela amizade, companheirismo e amor.

À **Dani**, pela total dedicação, paciência, incentivo, e acima de tudo, pelo amor.

“Vivo por aqueles que me amam, por aqueles
que me conhecem de VERDADE.”

(George Linnaeus Banks)

Ofereço à minha filha Bruna Morales Burini

AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador, Prof. Adjunto Enio Pedone Bandarra, pela orientação e coragem de ousar trabalhar com novas idéias e conceitos, correndo os riscos inerentes a esta atitude. A quem dedico admiração pela paixão à pesquisa e ao trabalho, por todos os ensinamentos, pela confiança e amizade nestes anos de convivência.
- À minha co-orientadora Prof. Ass. Dra. Renée Laufer Amorim pela concessão das condições necessárias para a realização deste trabalho e principalmente pela amizade.
- À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp – Campus de Botucatu, e à seção de Pós-Graduação, por toda a ajuda nestes anos, desde a residência até o doutorado.
- À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos e constante incentivo ao trabalho e à minha formação.
- Aos Professores Doutores: Carlos Roberto Teixeira, Sheila Rahal, José Joaquim Tilton Ranzani e Cláudia Valéria Seullner Brandão, pelo respeito, amizade e possibilidade de utilização dos ambulatórios da Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais.
- Aos Professores Doutores Nereu Carlos Prestes, Sony Dimas Bicudo, João Carlos Pinheiro Ferreira e Maria Denise Lopes, por toda colaboração, carinho, incentivo e amizade no decorrer do experimento.
- Aos Professores Doutores Júlio Lopes Sequeira, Noeme Sousa Rocha, Laura Figueiredo, Raphael L. Andreatti Filho, Lígia P. Boretti e Márcio Kuchembuck pelos anos de convivência, respeito, amizade e compreensão.
- Aos amigos César e Hélio, pela valiosa análise estatística de grande parte dos resultados deste trabalho.
- Às veterinárias Marcela Marcondes Pinto Rodrigues e Giovana Wingeter di Santis pelo incentivo e apoio irrestrito na busca de soluções para todas as dificuldades encontradas na condução das análises imunoistoquímica deste experimento.
- Aos Residentes da Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais pela intensa amizade, companheirismo e ajuda imprescindível na coleta de dados para o experimento.
- Aos residentes da Patologia Veterinária, Giuliana, Didier e Arita, como também aos residentes da Ornitopatologia, Rose, Anita e Ticiane, pela amizade e por tornarem o doutorado mais divertido!
- Aos amigos Pós-Graduandos Júlio (Jamaica), Paola, Renatinho, Leandrinho, Pedro (Pânico), Rafael, Guilherme (Ornito), Adriana P. Pessoa, Edna T. de Lima (Galega),

Camila Dias Porto, Luciano Fonseca, Celmira Calderón e Ana Paula, que além da amizade, ajudaram de alguma forma no bom andamento do projeto.

- Aos amigos veterinários Alfredo F. da Maia Lima, Ana Cristina A. Zablit, Otávio A. Filho, e tantos outros que foram tão importantes durante estes anos de dedicação à Tese.

- À aluna e amiga Bruna B. Beccheli e a todos os alunos e estagiários que freqüentaram o laboratório de Patologia, com os quais tive o prazer de desfrutar momentos agradáveis.

- Aos amigos Maury Raul, Noel de Almeida Mello, Luis A. Matiazzi e Onivaldo Martins (Vadolino) por sua amizade, alegria e incentivo constante.

- À amiga Marlene Dias Camargo, por ter tornado estes anos mais divertidos e agradáveis.

- Às bibliotecárias Rosemary C. da Silva e Luciana Pizzani, pela correção das referências bibliográficas e Selma de Jesus pela ficha catalográfica.

- Às amigas Marluce Betini e Maria Luiza Deléu da Silva, pelo carinho, amizade e atenção durante estes anos de pesquisa.

- Ao Daniel Cristian Ornelas de Oliveira e Sílvio Geraldo dos Santos Júnior pela documentação fotográfica e pela atenção demonstrada em todas as situações em que nos encontramos.

- Ao amigo Antônio Cláudio Morales Júnior (Claudinho) e Edílson de Souza Freire, pela amizade e pela importante ajuda durante estes anos.

- Enfim, a todos os professores, funcionários e colegas pelo carinho e convivência agradável, conseguindo transformar o local de trabalho em um ambiente prazeroso.

ÍNDICE

RESUMO	2
ABSTRACT.....	3
REVISÃO DE LITERATURA	5
CÂNCER DE MAMA	7
OBJETIVOS.....	44
MATERIAL E MÉTODOS	45
RESULTADOS	55
DISCUSSÃO.....	77
CONCLUSÕES.....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
ANEXOS.....	118

BURINI, C.H.P. Associações do índice de proliferação e de apoptose celular com características clínicas, epidemiológicas e histopatológicas do câncer mamário de cadelas sem raça definida. Botucatu, 2007. 126p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Com o objetivo de caracterizar pelo método histológico e imunoistoquímico o câncer de mama de cadelas sem raça definida (SRD) foram estudados 40 animais com distribuição uniforme nos estágios I, II, III e IV da doença. Todos os animais foram submetidos a anamnese, exame físico e complementares (Citopatológico, Raio x, Ultra Som) para o estadiamento clínico do câncer (TNMc), amostra histológica da lesão para caracterização do tipo de tumor e amostra imunoistoquímica para determinação molecular das células em apoptose (caspase 3) e proliferação (PCNA). A amostra foi caracterizada com predominância de idade acima de seis anos (92,5%), obesos (57,5%) com ingestão de dieta mista (80%) caseira-industrial. 80% das cadelas já tiveram cria, apresentando pseudogestação (40%), tumoração das mamas inguinais (70%), em ambas as cadeias, com nódulos multicêntricos (82,5%) de incidência bilateral (60%), prevalecendo nódulos de tamanho inferior a 2cm de diâmetro (37,5%). Prevaleceu o carcinoma simples (70%) em relação ao carcinoma complexo (30%). Os animais com carcinoma simples apresentaram características de porte grande (50%), obesidade (57%), cios regulares (89%) e múltiparas (82%) e prevalência idêntica entre os estadiamentos clínico (70%). O estadio mais grave (IV) esteve associado aos animais com idade média de 8 anos, ausência de obesidade (60%). A imunomarcagem de PCNA e caspase-3 não apresentou diferença significativa entre os tipos de tumor, suas características clínicas e grau histológico, no entanto a caspase-3 teve associação significativa entre o estadiamento clínico (I<III e II<III) e presença de ulceração tumoral ($P<0,049$).

Unitermos: cão, câncer mamário, estadiamento clínico, histopatologia, imunoistoquímica.

BURINI, C.H.P. Clinical, epidemiological and histopathological association with PCNA and apoptose breast câncer cell index of mongrel bitches. Botucatu, 2007. 126p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The severity of breast cancer in mongrel animals is not defined yet in its clinical, histologic and imunoistoquimical associative aspects. With the aim to establish that characterization we studied 40 bitches, 3-15 years old, mixed breed attended at the U. Vet. Hospital ambulatories in compliance with current ethical and pathological rules. The animals were allotted according to their clinical stage in groups stage I, II, III and IV with 10 animals each. After physical examination and lifestyle records. The tumor nodules were evaluated macro-and-microscopically, the later through histopathologically and imunoistopathologically. From these data the animals were classified as predominantly up to six years old (92,5%), obese (57,5%), presenting simple carcinoma (CS) more frequent (70%) than complex carcinoma type (30%). 80% of the animals wasan't nuliparus, showing pseudopregnancies (40%), having multicentric nodules (82,5%) sizing less than two cm diameter (37,5%), located inguinally (70%) in both side mammary chains. The immunohistochemistry label for PCNA and caspase-3 were not associated with tumors type, clinical aspects and histological grade, however only caspase-3 had significant association with clinical stage (I<III and II<III) and tumors ulceration ($P<0,049$).

Key words: bitches mammary gland cancer, clinical stages, histopathology, immunohistochemical.

INTRODUÇÃO

Na cadela, as neoplasias mamárias representam as lesões tumorais mais freqüentes, praticamente em todas as partes do mundo (MOULTON, 1990; MISDORP *et al.*, 1999). No período de janeiro de 1997 a dezembro de 2005 foram diagnosticados no Serviço de Patologia Veterinária do Hospital Veterinário FMVZ-Unesp de Botucatu 1204 casos de neoplasia mamária canina, 1198 (99,5%) acometeram as fêmeas, sendo 1119 (92,7%) desta considerada maligna, das quais 585 (48,5%) foram em animais sem raça definida (SRD) (BURINI *et al.*, 2006).

As características biológicas de um tumor são importantes para estimar o prognóstico da sua evolução e a conduta terapêutica apropriada. Essas características podem ser dimensionadas por critérios clínicos, cito/histopatológicos, imunoistoquímico e bioquímico-moleculares, com metodologias nem sempre padronizadas e classificações de gravidade nem sempre consensuais.

Considerando-se a raridade do uso associado desses indicadores em animais e a inexistência de informações deste tipo em câncer de mama de cadelas Sem Raça Definida (SRD) de diferentes portes, realizou-se o trabalho anterior (BURINI, 2002). Dentre os resultados obtidos verificou-se que alterações bioquímicas pró-oxidantes e obesidade estavam relacionadas às formas clínicas menos grave da doença enquanto que as alterações bioquímicas de caquexia com as formas mais graves.

Pretende-se agora associar a gravidade da doença, pelos critérios clínico (TNMc) e histopatológico, com os indicadores moleculares da apoptose e proliferação celular (*caspase 3* e *PCNA*) determinados no tecido neoplásico. Para tanto, foram estudadas 40 cadelas portadoras de câncer de mama, SRD atendidas no Hospital Veterinário (HV) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Unesp/Botucatu, devidamente triadas e eticamente manipuladas. A classificação do tipo de câncer e o estadiamento da doença foram associados, estatisticamente, às alterações imunoistoquímica do câncer mamário de cadelas SRD.

REVISÃO DE LITERATURA

Medicina Comparada

Os tumores mamários espontâneos dos canídeos apresentam várias características epidemiológicas, clínicas, bioquímicas e biológicas semelhantes aos da espécie humana, motivo pelo qual vêm sendo utilizados como modelos para o conhecimento dos vários aspectos da carcinogênese mamária humana (SCHINEIDER, 1970; STRANDBERG, 1974; O'BRIEN, 2000; MARTINS *et al.*, 2002; CASSALI *et al.*, 2005). Dentre as semelhanças destacam-se a idade do aparecimento, frequência, morfologia, órgãos alvo de metástases, evolução clínica, presença de receptores hormonais, o efeito protetor da ovariectomia e o tratamento cirúrgico (MOULTON, 1990; ZUCCARI *et al.*, 2001). Os diversos métodos de diagnóstico também vêm apresentando resultados similares entre ambas às espécies, reforçando a proposta deste animal como modelo para estudo da carcinogênese mamária humana (CASSALI, 2000; BURINI, 2002). Em estudos anteriores foi mostrado boa associação entre os critérios de gravidade clínico e citopatológico com os estados protéico-energético e de estresse oxidativo das pacientes com câncer de mama (BURINI, 2002).

Também foi demonstrado que as neoplasias mamárias de cães apresentam o fenótipo antigênico comparável àquele observado em lesões de mama em mulheres, como a homologia entre os genes BRCA-1 humano e do cão (MOTTOLESE *et al.*, 1994; SZABO *et al.*, 1996). Existem, contudo, diferenças entre os tumores mamários do homem e do cão. Uma das mais importantes diz respeito à frequência dos tumores complexos mamários que são raros nos humanos, mas estão entre os mais frequentes nos caninos (STRANDBERG & GOODMAN, 1974; CASSALI, 2000).

Em cadelas, foram observados resultados similares aos descritos na mulher, tanto pela maior expressão do MIB-1 (marcador imunoistoquímico para avaliar a proliferação celular) nos tumores malignos da mama, principalmente

naqueles menos diferenciados, quanto pela correlação inversa com a imunomarcção para o receptor de progesterona (CASSALI, 2000). Verificou-se ainda relação entre o tamanho do tumor e a expressão de receptores para progesterona, sendo a imunomarcção menor nos tumores maiores que 5cm (CHIARELLI *et al.*, 2000). Contudo, trabalhos que relacionam os receptores para esteróides sexuais com o desenvolvimento de tumores mamários na cadela são escassos.

Em Medicina Veterinária, grande esforço tem sido realizado na tentativa de acrescentar aos fatores de prognóstico clássicos (tamanho do tumor; presença de ulceração cutânea; invasão ganglionar linfática) novos parâmetros, de natureza molecular, que auxiliem a decisão clínica, à semelhança do verificado em Medicina Humana. Mas com o aumento da frequência das neoplasias e a preocupação crescente do proprietário em aumentar e melhorar a sobrevida do paciente tornam necessária a avaliação da eficácia desses procedimentos, a fim de incorporá-los na medicina veterinária.

Com isso, o propósito deste trabalho foi estudar uma série de tumores mamários com o objetivo de determinar a importância prognóstica de algumas características clínicas, histológicas e imunoistoquímica do câncer de mama em cadelas SRD.

Histoembriologia da glândula mamária

A mama possui amplo espectro de morfologia normal que varia conforme a fase do ciclo estral, ou de acordo com a fase da vida do indivíduo; puberdade, gestação, lactação e involução, ou ainda com o efeito de qualquer droga ou terapia hormonal (HARVEY, 1996; RAHAL *et al.*, 1995; ZAKHOUR & WELLS, 1999).

Os estágios da mamogênese são definidos pelo desenvolvimento sexual e reprodutivo da fêmea (IMAGAWA *et al.*, 1994). O principal desenvolvimento pós-fetal é simultâneo à puberdade, sob a influência dos hormônios ovarianos

estrogênios e progesterona (ROSS *et al.*, 1993; BURKITT *et al.*, 1994; SILVERMAN, 1996; ZUCCARI *et al.*, 2001).

Na formação alveolar, as células mioepiteliais não proliferam na mesma proporção que o epitélio secretor, permitindo contato direto entre este e a membrana basal, ou seja, a ação estimuladora desempenhada pelo estroma torna-se efetiva sobre as próprias células secretoras (GETTY, 1981; EVANS & CHRISTENSEN, 1993; BURKITT *et al.*, 1994; DYCE *et al.*, 1996; PARK & JACOBSON, 1996; SILVERMAN, 1996; ZUCCARI *et al.*, 2001).

Os carnívoros domésticos não entram em menopausa, e as mamas continuam sujeitas às influências hormonais até idade avançada (ZUCCARI *et al.*, 2001).

CÂNCER DE MAMA

Epidemiologia

De acordo com dados estatísticos obtidos da casuística nacional é possível caracterizar a elevada incidência de tumores mamários. Estas lesões representaram aproximadamente 52% de todas as neoplasias na fêmea canina (SCHNEIDER, 1970; BRODEY *et al.*, 1983; WITHROW & MacEWEN, 1996). Os estudos desenvolvidos com o objetivo de conhecer a proporção de tumores mamários benignos e malignos têm conduzido a resultados diferentes, embora algumas fontes descrevam que aproximadamente 50% dos tumores em cães são malignos. Entretanto, na literatura pode-se encontrar uma disparidade de dados no que se refere à prevalência dos tumores malignos, com valores superiores a 70%. Talvez isto possa ser explicado, em parte, pela dificuldade encontrada em proceder ao diagnóstico diferencial entre neoplasias benignas e malignas da mama de cadelas, possivelmente devido à falta de uniformidade nos critérios de distinção entre os dois tipos de lesões, sobretudo no caso de tumores do tipo complexo (CASSALI, 2000; BURINI, 2002).

Os tumores mamários acometem com maior frequência fêmeas entre 10 e 11 anos de idade, sendo rara em animais com menos de 5 anos de idade (WITHROW & MACEWEN, 1996).

A princípio não existe predileção racial, mas alguns trabalhos apontam as raças Poodles, English Spaniel, Brittany Spaniel, English Setter, Pointer, Fox Terrier, Boston Terrier e Cocker Spaniel como predisponentes. Os animais das raças Boxer, Grey Hounds, Beagles e Chihuahuas apresentaram menor risco de desenvolverem neoplasias mamárias (MEUTEN, 2002; RUTTEMAN *et al.*, 2001).

Etiologia

O aparecimento de tumor maligno resulta de uma série de eventos diferentes, gerando uma célula transformada (GATENBY & FRIEDEN, 2002). Dentre os estímulos iniciais dessas; amplificações, mutações, translocações, deleções e desregulação gênica figuram as ações de radiações ionizantes, vírus, hormônios e radicais livres. Dentre esses agentes, o viral e a radiação são pouco consensuais (ZUCCARI *et al.*, 2001).

As células dos tumores malignos apresentam genes que se expressam de modo instável e diversificado com conseqüente desregulação da diferenciação celular. Há geralmente, o envolvimento de três classes de genes, os proto-oncogenes, os genes oncosuppressores e os genes que regulam a apoptose. A transformação induzida por substâncias químicas metabolizadas no organismo ou no interior de determinadas células produz reagentes que causam danos ao DNA induzindo a mutações somáticas, como é o caso dos genes mutados *BRCA-1*, *BRCA-2* e *p53* do tumor de mama (LESLIE & HOWARD, 1992).

Do ponto de vista genético as neoplasias mamárias em humanos manifestam-se como esporádicas, familiares ou hereditárias. A forma esporádica resulta de mutação cromossômica em indivíduos até então sem pré-disposição à doença. Na forma familiar a doença está presente em dois ou mais indivíduos parentes em primeiro ou segundo graus. Por fim, a forma hereditária é caracterizada por padrão autossômico dominante de transmissão, o que determina

alto risco e precocidade etária ao diagnóstico. Em cadelas, a forma hereditária de neoplasia mamária é maior em raças definidas como Pointers, Retriviers, English Setters e Spaniel, Poodles, Boston Terriers e Daschunds (MOULTON, 1990).

A dieta figura entre os principais responsáveis pela etiologia e prevenção do câncer, sendo a principal rota de exposição dos animais aos carcinógenos químicos (GREENWALD, 1999; GREENWALD *et al.*, 2001). Dietas contendo elevados níveis de ácidos graxos poliinsaturados (*PUFAS*) podem favorecer seu acúmulo nos tecidos, tornando-os mais vulneráveis para a peroxidação lipídica, especialmente se a peroxidação superar o mecanismo antioxidante (WANDER *et al.*, 1997; OBERLEY, 2002; BURINI, 2002; BURINI *et al.*, 2004). Adicionalmente, gorduras saturadas são pró-inflamatórias e imunossupressoras enquanto que as insaturadas não. Destas últimas, os ácidos graxos ômega-3 são anti-inflamatórios e imunoestimulantes, diferentemente dos ácidos graxos ômega-6 (DAS, 2001).

No que se refere à dieta PELETEIRO (1994); PEREZ *et al.* (1998) e SOREMNO (1998) concluíram que o risco de desenvolvimento de neoplasias mamárias pode estar ligado a fatores nutricionais os quais interagem já nos primeiros meses de vida. Os pesquisadores constataram que a obesidade no primeiro ano de vida, assim como um ano antes do diagnóstico pode predispor as fêmeas às neoplasias.

A alimentação caseira, principalmente a alta ingestão de carnes bovinas e suínas apresentou correlação positiva com o desenvolvimento tumoral em cadelas (FIDLER & BRODEY, 1967; FERGUSON, 1985).

Cada vez mais estudos clínicos, epidemiológicos e experimentais mostram o envolvimento das espécies reativas de oxigênio (ERO) nos processos neoplásicos (BURINI, 2002; HEATON *et al.*, 2002). As ERO são potencialmente capazes de oxidar proteínas, lipídios, organelas citoplasmáticas e materiais genéticos. Têm-se postulado que estas alterações poderiam propiciar o aparecimento de alteração celular neoplásica (GALIZIA & WAITZBERG, 2001; OBERLEY, 2002).

As hipóteses mais citadas sobre a etiologia dos tumores mamários referem-se à obesidade e à atividade hormonal (SCHNEIDER *et al.*, 1969;

SONNENSCHNAIN *et al.*, 1991; MORRISON, 1998; ZUCCARI, *et al.*, 2001). Os autores acima descritos são unânimes em afirmar que alguns tumores mamários são hormônio-dependentes. A hipótese do envolvimento hormonal na etiologia dessas neoplasias tem sido a mais aceita, pois os pesquisadores constataram que o risco de desenvolvimento de tumores mamários é de 0,5% em fêmeas esterilizadas antes do 1º estro. Este risco é de 8% e de 26% em fêmeas submetidas à ovariectomia após o 1º e 2º ciclo estral, respectivamente. ZUCCARI *et al.* (2001) citaram que em pesquisas realizadas na Califórnia (EUA) foi observado que as fêmeas da espécie canina não esterilizadas cirurgicamente, apresentaram incidência de tumores mamários 4 a 7 vezes maior quando comparadas as fêmeas submetidas à ovariectomia. Em decorrência disso, atualmente preconizasse a esterilização cirúrgica precoce, antes do primeiro estro, em fêmeas da espécie canina.

Estado endócrino/Carcinogênese hormonal

Os hormônios estão dentre os vários fatores indutores ou promotores da carcinogênese. Sejam endógenos ou exógenos, eles estimulam a proliferação celular predispondo às alterações genéticas (HENDERSON *et al.*, 1988; HENDERSON & ROSS, 1996; HENDERSON & FEIGELSON, 2000). Mas, ainda há controvérsias sobre a gênese das neoplasias hormônio-dependentes. Postula-se que na carcinogênese hormonal, diferente daquela induzida por vírus ou agentes químicos, a proliferação celular não necessita de um agente iniciador específico.

Os hormônios induzem proliferação celular com conseqüentes mutações genéticas que darão origem à célula neoplásica (MEUTEN, 2002). No entanto, para CARREÑO *et al.* (1999), a participação dos hormônios na carcinogênese se restringe à proliferação das células já transformadas por outros carcinógenos. Os genes específicos envolvidos na progressão das neoplasias hormônio-dependentes permanecem desconhecidos, contudo, acredita-se que os oncogenes, os genes supressores tumorais e os genes do reparo do DNA estejam

envolvidos na carcinogênese hormonal, principalmente naquela induzida pelos esteróides sexuais (GUYTON, 1991; HENDERSON & FEIGELSON, 2000).

As neoplasias hormônio-dependentes podem originar-se de mutações genéticas resultantes da proliferação de células normais ou da multiplicação de células já transformadas por outros carcinógenos. Alguns hormônios e drogas anti-hormonais estão sendo utilizados com sucesso no tratamento dessas neoplasias em humanos (SILVA *et al.*, 2004). Apesar da frequência elevada das neoplasias hormônio-dependentes nos animais, seu tratamento com antagonistas hormonais e fármacos anti-hormonais, bem como a identificação imunoistoquímica de receptores hormonais nas neoplasias não fazem parte da rotina dos hospitais veterinários (CASSALI, 2000).

O estilo de vida da sociedade moderna contribui para aumentar a exposição da população a alguns fatores ambientais, nutricionais, químicos e hormonais potencialmente carcinogênicos. É claro que a interferência do homem nos hábitos alimentares dos animais e no seu ambiente também o coloca sob o mesmo risco. Talvez essa seja uma das explicações que equivale no homem e nos animais (MOULTON, 1990). Na oncologia, é necessário ir além do diagnóstico e buscar informações sobre o prognóstico e a terapêutica mais eficiente para a neoplasia em questão. No câncer de mama humano, a imunomarcagem de receptores para estrógeno e progesterona auxilia na escolha do tratamento. Mas, as chances de sucesso também estão relacionadas com o diagnóstico precoce já que as neoplasias decorrentes dos desequilíbrios hormonais, na sua fase inicial, ainda são hormônio-dependentes com melhor prognóstico em comparação àquelas que já adquiriram independência hormonal (NORMAN & LITWACK, 1997).

Em cães e gatos, a progesterona exógena estimula a síntese de hormônio do crescimento na glândula mamária com proliferação lóbulo-alveolar e conseqüente hiperplasia de elementos mioepiteliais e secretórios, induzindo a formação de nódulos benignos em animais jovens (MOL *et al.*, 1997; RUTTEMAN *et al.*, 2001; MEUTEN, 2002). O estrógeno estimula o crescimento ductal. Entretanto, o risco de desenvolvimento de neoplasias malignas tem sido

observado na administração contínua e em altas doses de estrógeno associado a progesterona (MORRISON, 1998; RUTTEMAN *et al.*, 2001).

Receptores para estrógeno, progesterona, andrógenos, prolactina e para o fator de crescimento epidermal já foram demonstrados nos tumores de mama de cadelas, havendo também a coexistência desses receptores numa mesma neoplasia (MEUTEN, 2002).

Estudos epidemiológicos demonstraram que a administração de esteróides ovarianos ou derivados sintéticos aumentou a formação de tumores mamários nas cadelas (RUTTEMAN, 1990). A incidência de neoplasia mamária benigna aumentou após o tratamento com progestágenos exógenos nas cadelas (MISDORP, 1988).

Acredita-se que exista relação entre o número desses receptores e a capacidade proliferativa das células neoplásicas (COSTA *et al.*, 2002). Na cadela, é elevada a proporção de tumores benignos da mama positivos para receptores de estrógeno e progesterona. Ao contrário, apenas uma parte das neoplasias malignas apresentam esses receptores e em concentrações menores (CASSALI, 2000; GERALDES *et al.*, 2000), pois com a progressão do tumor e aumento da malignidade ocorre redução da dependência hormonal e maior autonomia das células neoplásicas (MENDONÇA *et al.*, 1992; GERALDES *et al.*, 2000). Além disso, há correlação inversa entre o número de receptores para estrógeno com a atividade da glucose-6-fosfatase e da 6-fosfogluconato-desidrogenase, enzimas conhecidas por estarem relacionadas com a malignidade das células neoplásicas (NERURKAR *et al.*, 1990).

Em 1994 evidenciou-se a produção de hormônio do crescimento (GH) nas glândulas mamárias, estimulado pela progesterona. Essa descoberta iniciou investigações a respeito dos efeitos biológicos do GH mamário sobre a glândula mamária dos cães; mais especificamente a relação do GH mamário na biologia da glândula, durante a fase lútea do ciclo ovariano. Além disso, desde que os progestágenos foram associados ao aumento da incidência de tumores mamários nos cães a questão discutida foi se o GH mamário poderia mediar os efeitos tumorigênicos da (vanGARDEREN & SCHALKEN, 2002).

Tanto a progesterona endógena como a exógena pode estimular produção excessiva de GH nas cadelas. Essa produção de GH pelas mamas não é exclusiva dos cães; é também observada em amostras de tecido mamário normal, lesões benignas e malignas na mulher (MOL *et al.*, 1996).

O efeito promotor da progesterona, sobre o tumor mamário nas cadelas, depende de seu efeito estimulador sobre o hormônio do crescimento - GH. A progesterona aumenta a produção de GH nos cães; o que permanece incerto é se a produção elevada de GH é o fator responsável pela indução do tumor mamário ou se representa apenas um efeito secundário da progesterona, sem relação com o fator promotor tumoral primário associado a esse hormônio. (RUTTEMAN, 1990).

Receptores para estrógeno (ER), progesterona (PR) e para prolactina (PRL-R) estão presentes no tecido mamário normal das cadelas. Tumores mamários benignos mostram positividade para ER, PR e PRL-R; ao contrário neoplasias primárias malignas apresentaram baixas concentrações desses receptores (HENDERSON *et al.*, 1988; RUTTEMAN, 1990; MILLER, 1991). O envolvimento da prolactina no tumor de mama nas cadelas é incerto. O número de receptores descoberto nos tumores de mama benignos não é mais alto do que no tecido normal, e somente 30% dos tumores malignos apresentam receptores para prolactina (RUTTEMAN, 1990; MISDORP, 1988).

A descoberta que os níveis de ER, PR e PRL-R nos tumores mamários malignos e nas metástases são mais baixos do que na glândula normal e nas lesões benignas, indicam uma perda do controle da função gênica para esses receptores (RUTTEMAN, 1990; MISDORP, 1988).

O crescimento do tecido mamário normal e/ou neoplásico é estimulado não só pelos hormônios esteróides, mas também por fatores de crescimento, como o fator de crescimento epidermal (EGF) e o fator de crescimento transformador (TGF- α). Tem sido sugerido que a expressão dos genes que controlam esses fatores de crescimento, ou seus receptores, nas células "transformadas" poderiam resultar em um crescimento seletivo e escapar de um mecanismo de controle normal (MOL *et al.*, 1996).

A glândula mamária é um dos órgãos mais dinâmicos do organismo e tanto a divisão celular como a morte celular programada, apoptose, são altamente controladas (MOL *et al.*, 1996).

Um dos controladores mais importantes da divisão celular nos mamíferos é representado pelo eixo hipófise – GH / fígado (fator de crescimento semelhante à insulina - IGF-I) (HENDERSON & ROSS, 1996).

O risco de desenvolvimento do câncer de mama é essencialmente determinado pela intensidade e duração da exposição do epitélio mamário à ação conjunta da prolactina e do estrógeno (KOJIMA *et al.*, 1996). Aparentemente a prolactina facilita a ação mitótica do estrógeno, aumentando o número de seus receptores. Mas a possibilidade da prolactina estimular a atividade mitótica das células do epitélio mamário não pode ser afastada (MULDOON, 1981). O estrógeno promove o crescimento celular por estimular a liberação do fator de crescimento tumoral alfa e fator de crescimento semelhante à insulina (NORMAN & LITWACK, 1997).

Existem evidências entre altos níveis do fator de crescimento semelhante à insulina ligado a proteína-3 (IGFBP-3) com pior prognóstico em carcinomas invasivos mamários na mulher, sugerindo seu potencial mitogênico (VESTHEY *et al.*, 2005).

A progesterona induz modificações importantes na glândula mamária, criando um ambiente altamente proliferativo no interior da mama. Concentrações elevadas de GH, juntamente com níveis crescentes de IGF-I e II, estimulam o recrutamento das "*stem cells*", seguida pela proliferação e diferenciação celular como observada em outros tecidos. Alteração da fase de proliferação da glândula mamária pode provocar a formação de tumores malignos e benignos (MOL *et al.*, 1996; vanGARDEREN & SCHALKEN, 2002).

Progesterona, GH, e IGF-I têm um papel essencial em tornar a glândula mamária mais susceptível aos fatores carcinogênicos indutores de mutações, resultando no desenvolvimento do tumor ou estimulando o crescimento de tumores já estabelecidos (MOL *et al.*, 1996).

Durante a fase lútea do ciclo ovariano, a glândula mamária é caracterizada por proliferação transitória e diferenciação das células epiteliais. A sugestão que o GH mamário estimulado pela progesterona, possa mediar essa proliferação, associada a progesterona representa uma hipótese (MOL *et al.*, 1996; van GARDEREN *et al.*, 1997).

Como representação do ciclo ovariano caracterizando as modificações morfológicas do tecido mamário, têm-se: a fase inativa do tecido mamário que coincide com a fase de anestro do ciclo ovariano, nessa fase o tecido mamário consiste principalmente de ductos; o estágio de proliferação do tecido mamário, que corresponde à fase lútea do ciclo, a mama é caracterizada por um crescimento nodular dos ductos, esse crescimento é representado por uma população de células epiteliais que se proliferam transitoriamente; a fase de diferenciação onde essa população celular se transforma em tecido glandular lóbulo/alveolar, com capacidade de síntese protéica e o estágio de regressão, onde a estrutura alveolar involui por apoptose das células epiteliais, as quais são ingeridas pelos macrófagos e/ou células vizinhas (van GARDEREN & SCHALKEN, 2002).

Receptores para hormônios tireoidianos também já foram observados na glândula mamária normal e neoplásica, sugerindo a participação dos hormônios da tireóide no câncer de mama da mulher (NOGUEIRA & BRENTANI, 1996). No hipotireoidismo, o aumento da secreção de prolactina tem sido incriminado como um dos fatores que agravam o prognóstico da neoplasia mamária (SMYTH, 1997).

Tipos de câncer mamário

Os adenocarcinomas mamários são neoplasias epiteliais dos ductos mamários maiores, dos ductos interlobulares, dos ductos intralobulares e dos alvéolos. Compreendem três padrões de proliferação: acinar, tubular ou papilar, dependendo do arranjo que as células neoplásicas apresentem, embora habitualmente, seja possível observar vários padrões em diferentes locais de uma mesma neoplasia. Além disso, proliferações mioepiteliais em matriz

condromucinoso – que caracterizam as formações complexas – também podem ser observadas. Os tumores mistos, por sua vez, apresentam proliferação de células mioepiteliais, à semelhança dos tipos complexos de adenocarcinoma mas, nesse caso, estas células se diferenciam em ilhas de tecido cartilaginoso e/ou ósseo podendo, inclusive, apresentar medula hematopoética (MISDORP *et al.*, 1973; ZEZZA NETO, 1997).

Carcinoma *in situ* é freqüentemente multicêntrico e não é geralmente visível. Pode ser parte de lesões fibrocísticas ou encontrado acidentalmente próximo a carcinomas invasivos e outros tipos de tumores. O carcinoma não invasivo tipo simples são freqüentemente encontrados em cães. Não há relatos sobre a versão não invasiva do tipo complexo. As células tumorais não invadem a membrana basal e podem ter várias apresentações: cribriforme, sólido, eventualmente com necrose central (comedo). A diferença entre carcinoma *in situ* e hiperplasia típica ou atípica pode ser difícil, especialmente para aqueles de células pequenas (MOULTON, 1990).

O carcinoma complexo é relativamente comum em cães. Geralmente são tumores lobulados, composto por células epiteliais e mioepiteliais (TAVARES *et al.*, 2006). O epitélio luminal pode ter apresentação tanto tubulopapilar como também sólida. Pode ocorrer metaplasia escamosa em alguma porção. O tipo fusiforme de células mioepiteliais são freqüentemente arranjados de forma reticulada. A substância mucóide intercelular ocasionalmente encontrada deve ser diferenciada de cartilagem imatura que é encontrada nos carcinossarcomas, os quais são caracterizados pela presença de células entremeadas em lacunas de matriz cartilaginosa e/ou óssea (ABURTO *et al.*, 1997; ZEZZA NETO, 1997). O crescimento expansivo é comum, e a invasão junto aos vasos linfáticos é rara (10%). Diferenciar carcinoma complexo bem diferenciado de adenoma complexo pode ser difícil. Ausência de cápsula, crescimento infiltrativo, alta celularidade, necrose e elevados índices de mitose são indicativos de malignidade, tempo médio de sobrevida de 10 meses (MEUTEN, 2002; TAVARES *et al.*, 2006).

Carcinoma simples, ou o também chamado adenocarcinoma, é a neoplasia maligna mamária mais comum nas cadelas. É composto por células do tipo

epitelial, a qual apresenta forte tendência para infiltrar para os tecidos e vasos adjacentes (acima de 50%) (SCHMITT, 2000). A quantia de estroma pode variar consideravelmente, e a presença de linfócitos peritumorais são comuns, mesmo com associação de necrose ou não. Baseado em sua diferenciação e comportamento biológico, pode ser graduado em termos com aumento de malignidade em : túbulopapilar, sólido ou anaplásico. A sobrevida média é de 10-12 meses (BRODEY *et al.*, 1983; FERGUSON, 1985; BREARLEY, 1989; MOULTON, 1990; WITHROW & MacEWEN, 1996).

Carcinoma tubulopapilar é caracterizado pela formação de túbulos com ou sem projeções papilares. Nos cães, carcinomas tubulares podem estar acompanhados por proliferação marcante de fibroblastos estromal no tumor primário ou na metástase. O componente estromal é usualmente escasso no tipo papilífero, o qual ocorre com freqüência. Uma variante especial é o tipo papilar cístico, o qual é usualmente bem demarcado e pode ser de difícil diferenciação de lesões benignas como a hiperplasia ductal papilomatosa. Metástase de lesões papilares císticas bem diferenciadas para linfonodos regionais já foram relatadas (MEUTEN, 2002).

No carcinoma sólido as células tumorais são arranjadas em “folhas”, “cordas” ou ninhos sólidos. Alguns são compostos por células com citoplasma vacuolizado, possivelmente de origem mioepitelial. A quantia de estroma varia de pouco a moderada (BREARLEY, 1989; MOULTON, 1990).

O carcinoma inflamatório é caracterizado por seu rápido crescimento, associado a eritema intenso, calor, dor e edema. O desenvolvimento do tumor, que se apresenta como uma massa firme e pouco circunscrita dá-se sob forma de placas que podem se distribuir indeterminadamente sobre a superfície corpórea do animal de maneira rápida e difusa. Essa massa mantém-se bem aderida ao foco e pode inclusive, apresentar-se ulcerada (BRODEY *et al.*, 1983; WITHROW & MacEWEN, 1996).

Freqüentemente, o carcinoma inflamatório, de crescimento desordenado e invasivo, ultrapassa os limites toraco-abdominais ventrais e acomete as regiões laterais adjacentes ao foco no corpo do animal (FERGUSON, 1985; BREARLEY,

1989; MOULTON, 1990). Possui alto poder metastático, e a primeira via de disseminação das células tumorais é a rede linfática. O enfartamento dos linfonodos regionais é facilmente observável por inspeção e palpação destes e, não raramente, os animais acometidos apresentam edema em um ou mais membros, provavelmente em virtude da invasão tumoral sobre os vasos linfáticos aferentes dos gânglios axilares e/ou inguinais superficiais, o que leva a hipofuncionalidade desses membros. Do ponto de vista microscópico, caracteriza-se como um carcinoma pouco diferenciado, com evidência de infiltrados celulares polimorfonuclear e mononuclear e população celular epitelial anaplásica. Pode estar associado a vários outros tipos de carcinomas que também acometem as mamas, muito embora se admita que o adenocarcinoma seja mais comumente observado nestes casos (SILVERMAN, 1996; STONE, 1998; BAKER & LUMSDEN, 1999; ZAKHOUR & WELLS, 1999; MEUTEN, 2002).

Comportamento biológico

Mesmo na ausência de causas manifestas de morte, os animais com câncer ainda perdem peso progressivamente e morrem. Geralmente a massa neoplásica não pode explicar completamente a morte em termos mecânicos, deve-se então cogitar sobre mecanismos mais sutis que desempenham papéis importantes na morte do paciente com câncer (RUBIN & FARBER, 2002).

Aproximadamente 70% de todos os cânceres de mama são palpáveis e quase 50% dos tumores com 0,6 a 1,0 cm de diâmetro são detectáveis no exame clínico (DONEGAN, 1988; FERREIRA *et al.*, 2006).

Salienta-se que achados clínicos característicos de outros tumores malignos (diâmetro maior que 5 cm, crescimento rápido, infiltração, eritema e edema) nem sempre são válidos para as neoplasias de mama. Havendo, pois, necessidade dos exames citológico e histológico para identificação de células e metástases (BRASIL, 1998; ZUCCARI, 1999; CAVALCANTE *et al.*, 2005).

A ulceração de lesões decorrentes de neoplasias mamárias é um processo não obrigatório nos estágios iniciais, mas geralmente ocorre em virtude de complicações durante a evolução da doença (ZUCCARI, 1999).

Ocasionalmente o cancer de mama pode retornar após o primeiro tratamento. Existem três tipos de recorrência no câncer de mama. A recorrência local, a qual as células permaneceram no local original, que após algum tempo voltaram a proliferar. Para muitos pesquisadores a recorrência local não é considerada como disseminação do câncer mamário, e sim como um fracasso do tratamento primário. Mesmo depois da mastectomia, os tecidos mamários próximos à pele e tecido adiposo permanecem possibilitando a recorrência local. A recorrência regional é mais séria que a local por indicar que o câncer se disseminou além dos limites da mama e linfonodos regionais. Pode ocorrer na musculatura peitoral, abdominal, nos linfonodos mais internos, entre as costelas, entre outros. A recorrência a distância, ou seja a metástase, é sem dúvida a pior delas. Uma vez fora do tecido mamário, usualmente o câncer pode se disseminar para os linfonodos regionais/sentinelas e a partir deste para qualquer outro local do organismo (FIDLER & BRODEY, 1967; ZUCCARI, 1999). A distribuição dos focos tumorais é determinada, em grande parte, pelas características anatômicas das veias e dos vasos linfáticos que drenam os locais onde se situam os tumores primários. No entanto, nos animais, a maioria dos tumores malignos metastatizam para os pulmões. Isto ocorre devido ao imenso fluxo de sangue que passa por este órgão e à grande trama de capilares, onde a circulação se torna mais lenta. O leito capilar pulmonar serve como filtro para os agregados de células tumorais que se alojam na árvore vascular, inserindo pseudópodos entre as células endoteliais e emigrando para o parênquima pulmonar (COTRAN *et al.*, 2000; RUBIN & FARBER, 2002).

O desencadeamento da metástase representa uma série de interações entre o hospedeiro e a célula tumoral, os quais incluem angiogênese, invasão, sobrevivência intravascular, instalação e proliferação em órgãos distantes (KLAUBER *et al.*, 2001; GATENBY & FRIEDEN, 2002).

As células tumorais que expressam o fenótipo de invasibilidade possuem a habilidade em degradar a matriz extracelular (MEC) e violar os compartimentos teciduais adjacentes. Isto está freqüentemente associado à expressão de enzimas como a metaloproteinase (MMP), geralmente presente em altas concentrações nas células metastáticas (MMP-2 e MMP-9 tipo IV collagenase). Outro aspecto importante destas células é a motilidade celular, que em resposta a sinais, as células metastáticas devem aderir e soltar repetidamente o substrato para conseguir a locomoção determinada. Além do substrato da MEC servir como “piso” para as células tumorais, também pode modular a quimiotaxia, assim como, expressar integrinas e MMP pelas células tumorais (CURRAN & MURRAY, 2000). Geralmente, células metastáticas dispõem maior motilidade que suas companheiras não metastáticas (MOORE, 2001).

A adesão entre as células tumorais está freqüentemente diminuída nos tumores invasivos e metastáticos. Apesar disso, os mecanismos que induzem a alterações nas adesões das células tumorais são pouco compreendidos, sendo que as proteínas E-caderinas têm recebido considerável atenção. Estas proteínas também parecem estar envolvidas na regulação da expressão das conexinas, importantes na comunicação entre as células. Estudo recente visando a expressão de conexinas e de E-caderina em glândulas mamárias normais, hiperplásicas e neoplásicas de cadelas, revelou que nas cadelas os tumores malignos apresentam alterações na expressão destas proteínas em relação às mamas normais (TORRES *et al.*, 2003). Outro estudo relacionado com a expressão de caderina-E em neoplasias benignas e malignas da mama em cadelas mostrou maior marcação para carcinomas metaplásicos e tumores benignos em relação a carcinomas ductais, associando desta forma, a menor expressão de E-caderina com a agressividade tumoral, inclusive maiores chances de formar metástases à distância, assim como o pior prognóstico (GOMES *et al.*, 2003).

Interações entre células neoplásicas com plaquetas ou com células imunológicas parecem regular a formação de metástases na fase em que as células tumorais estão na corrente circulatória (BYRNE *et al.*, 2000). O reconhecimento entre as células tumorais e endoteliais seguidos de fortes

interações e eventualmente retração das células endoteliais, facilitam possíveis interações entre células neoplásicas e matriz subendotelial. A dissolução desta matriz resulta na extravasão da célula tumoral do leito capilar, sendo as moléculas de adesão, como as integrinas e não-integrinas responsáveis por este processo (KLAUBER *et al.*, 2001; MOORE, 2001).

As células tumorais que extravasaram para o parênquima de outro órgão irão proliferar para formar micrometástases menores que dois milímetros de diâmetro. Pela angiogênese tumoral, estas micrometástases tornam-se clinicamente detectáveis. Fatores de crescimento, elaborados pelo estroma dos órgãos atingidos, são importantes reguladores parácrinos da proliferação da célula tumoral. Fibroblastos do hospedeiro podem ser importantes fontes de enzimas degradadoras de matriz extracelular (KLAUBER *et al.*, 2001; GATENBY & FRIEDEN, 2002).

As citocinas representam uma diversidade de grupos de moléculas peptídicas que participam de forma proeminente facilitando não somente o crescimento da neoplasia como também no aparecimento de metástases (HEIMANN *et al.*, 1997). Elas são mediadoras diretas das interações entre as células, portanto reguladoras das funções celulares e teciduais. A produção e liberação de citocinas são processos celulares estritamente regulados, podendo ser desregulado por transformações malignas (ALTUCCI & GRONEMEYER, 2001).

O fator de necrose tumoral (*TNF*), antiga caquexina, é o membro chave de uma grande família de citocinas e receptores cruciais na organização celular. A ativação de algum dos membros desses receptores implicará em uma variedade de respostas celulares dependendo do tipo e contexto celular (ALTUCCI & GRONEMEYER, 2001). Alguns destes receptores da família do *TNF* são também “death receptors” sinalizando o processo de apoptose numa variedade de células. É um potente fator linfóide, o qual exerce efeitos citotóxicos numa grande variedade de células tumorais e outras células alvo. Em tumores humanos a expressão do *TNF* foi evidenciada, e geralmente associada com pior prognóstico. Administração de altas doses locais de *TNF* em um tumor destrói seus vasos sanguíneos apresentando potente ação anti-cancer, mas quando produzida

cronicamente, pode agir como promotor endógeno tumoral, contribuindo com o desenvolvimento do estroma, necessário para o crescimento e expansão do tumor e formação de metástases (WAJANT *et al.*, 1999; DUNLOP & CAMPBELL, 2000; KAUFMANN & HENGARTNER, 2001; BALKWILL, 2002).

A habilidade de metastatizar para locais distantes é caracterizada quando as células tumorais adquirem a independência dos sinais fisiológicos reguladores, resultando no acúmulo de mutações, tornando as células tumorais invasiva e resistente à apoptose (HEIMANN *et al.*, 1997).

As metástases nos cães podem ocorrer por via linfática ou venosa. Nos carcinomas mamários, a via linfática parece ser a mais importante. A drenagem linfática faz-se para os gânglios linfáticos axilares e inguinais (BREARLEY, 1989; ENGSTRÖM *et al.*, 1989).

Câncer de mama com metástase ainda é considerado como uma doença incurável tanto na Medicina Humana como na Veterinária, sendo um dos fatores prognósticos mais importantes. Micrometástases não detectáveis clinicamente, certamente contribuem para a recorrência da doença nas pacientes portadoras de câncer de mama, no entanto pouco se conhece a respeito do mecanismo celular responsável por este controle (KLAUBER *et al.*, 2001).

Para Brodey, Golds-Chmidt e Roszel o câncer da glândula mamária é a causa mais comum de metástases pulmonares em cadelas. A demora pela procura de assistência Veterinária, certamente contribui pelos avançados estágios da doença em que os animais são encontrados no momento do diagnóstico (CASSALI, 2000; BURINI *et al.*, 2001; BURINI, 2002). Das neoplasias malignas mamárias nos cães, 25 a 50% delas apresentam metástases antes da cirurgia (MOULTON, 2002).

A existência de metástases torácicas, abdominais ou para tecido linfóide podem ser verificadas com o auxílio de exames por imagem. Desta forma pode-se determinar a proximidade de um tumor aos grandes vasos, determinar a natureza cavitária ou cística das massas e avaliar o volume tumoral inicial e pós-tratamento (CARTER, 1989; BRASIL, 2001).

Apesar da diversidade dos cânceres, existem algumas similaridades nas manifestações clínicas de pacientes portadores da doença progressiva. Mesmo pacientes que apresentam a doença limitada a um único local, por exemplo, mulheres e animais com câncer de mama sem evidências de metástase à distância, podem desenvolver efeitos sistêmicos, como a anorexia e caquexia, que freqüentemente acompanham o desenvolvimento da doença (MacDONALD *et al.*, 1995; DUNLOP & CAMPBELL, 2000; TISDALE, 2001; BURINI, 2002).

Pacientes com caquexia neoplásica refletem a profunda perda de tecido adiposo e magreza corporais. A anorexia, freqüentemente presente, é insuficiente para promover esta perda de peso, isto devido a: 1- caquexia envolve perda massiva da musculatura esquelética o que não ocorre durante a anorexia, 2- a suplementação nutricional não reverte o quadro de magreza, 3- caquexia pode ocorrer sem anorexia, e 4- a ingestão de alimento parece ser normal para a profunda perda de peso das pacientes com câncer. Por outro lado à anorexia pode aparecer quando: 1- existe diminuição do gosto e cheiro do alimento, 2- saciedade precoce, 3- produção de citocinas, como $TNF\alpha$ e $IL-1$, as quais agem diretamente no cérebro produzindo anorexia, entre outras. Produtos tumorais parecem ser mais importantes no desenvolvimento da caquexia (BERGHE *et al.*, 2000; TISDALE, 2001; BALKWILL, 2002).

Estudos têm sugerido que as citocinas, em particular $TNF\alpha$, $IL-6$, são responsáveis pela perda tecidual na caquexia pelo câncer (BALKWILL, 2002).

Vários estudos *in vitro* têm demonstrado que citocinas pró-inflamatórias como a $IL-6$, apresenta efeito citostático e citotóxico em células de câncer de mama, algumas vezes de maneira autócrina. Aumento significativo dos níveis séricos de $IL-6$ foram observados em pacientes com caquexia neoplásica quando comparados com pacientes com tipos tumorais semelhantes, mas sem a perda de peso (CRICHTON *et al.*, 1996; KOVACS, 2001; TISDALE, 2001).

Métodos diagnóstico e classificatórios

A classificação elaborada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para tumores e displasias da glândula mamária canina segue o máximo possível a proposta pela OMS para tumores mamários humanos (MISDORP *et al.*, 1999; ZUCCARI *et al.*, 2001). Basicamente, acreditam na importância em alcançar a concordância no registro da informação precisa da extensão da doença para cada localização anatômica, porque a descrição clínica acurada e a classificação histopatológica das neoplasias podem interessar a um número de objetivos correlatos, como ajudar o médico no planejamento do tratamento, indicação do prognóstico, ajudar na avaliação dos resultados de tratamento, facilitar a troca de informação entre os centros de tratamento e contribuir para a pesquisa contínua sobre o câncer (AJCC, 1989).

Neoplasias mamárias se apresentam usualmente como nódulos e cerca de 90% destas lesões são detectadas pelo exame clínico. Este deve seguir uma rotina padronizada, com condições ideais e a necessária tranquilidade, com levantamento mais completo possível da história pregressa. A inspeção e palpação constituem as duas etapas do exame físico, observando dados como, simetria glandular, localização, contorno, apresentação, tamanho e contorno do tumor, inflamações ou ulcerações, condições corpóreas e, particularmente, o envolvimento de linfonodos regionais e/ou evidências de metástase a distância com auxílio do exame citopatológico e raio x, respectivamente (BRASIL, 1998; MISDORP *et al.*, 1999; ZUCCARI *et al.*, 2001).

O sistema TNM trabalha prioritariamente com a classificação por extensão anatômica da doença determinada clínica e histopatologicamente. As classificações para o estadiamento clínico e patológico do câncer de mama propostas pela American Joint Committee on Cancer (AJCC) e UICC são as classificações TNM clínica (TNMc) e a TNM histopatológica (TNMp) (AJCC, 1989; EISENBERG & KOIFMAN, 2000). Os esquemas de classificação são freqüentemente revisados devido à aquisição constante de novas informações prognósticas (BRASIL, 1998; BRASIL, 2001).

A classificação é aplicável somente para carcinomas e deve haver confirmação histológica da doença. A sub-região anatômica de origem deve ser registrada, mas não é considerada na classificação. No caso de tumores múltiplos sincrônicos em uma mama, o tumor com a maior categoria T deve ser usado para a classificação. Os tumores de mama, bilaterais e sincrônicos, devem ser classificados independentemente, para permitir a divisão dos casos por tipo histológico. Os procedimentos para avaliação das categorias T, N e M são as seguintes: Categorias T – a extensão do tumor primário; Categorias N – a ausência ou presença de metástases em linfonodos regionais; Categorias M – ausência ou presença de metástase à distância.

Seguido pelo exame clínico completo e caracterização do estágio clínico da doença, atualmente se recorre, antes mesmo da classificação histopatológica, ao exame citopatológico. Este exame tem apresentado inúmeras vantagens como meio de diagnóstico, especialmente entre as alterações mamárias de cadelas. Durante o estágio inicial, pode diferenciar lesões tumorais inflamatórias de lesões neoplásicas, se for neoplasia, pode ser feita coleta de linfonodos regionais para melhor estabelecimento do estágio da doença, prognóstico e a presença de metástase (BAKER & LUMSDEN, 1999). Nos casos de tumores malignos aparentemente inoperáveis, o diagnóstico citológico positivo será definitivo, evitando a confirmação desnecessária por biopsia (ALLEN & PRASSE, 1986) e nos casos de recorrência pós-cirurgia, o exame citológico pode rapidamente e precisamente indicar a necessidade de novas intervenções. Na maioria dos casos, o diagnóstico pode ser estabelecido em poucos minutos, e a coleta do material não é traumática para as pacientes (BAKER & LUMSDEN, 1999; BURINI, 2002; CASSALI, 2000; SIMEONOV & STOIKOV, 2006).

Também microscopicamente são utilizados três métodos primários para classificar os tumores mamários: 1- histogenética; 2- classificação histológica e 3- prognóstico. Classificação histogenética é aplicada pela incerteza da especificidade da célula de origem de muitos tumores, de acordo com o arranjo histológico em papilares, tubulares, sólidos e anaplásicos e quanto à origem, em: lobulares ou ductais (MOULTON, 1990).

A melhor precisão diagnóstica e compreensão prognóstica, podem ser decorrentes da observação de características como presença ou não de infiltração, ulceração, inflamação, hemorragia, necrose, fibrose e metaplasia. Nas neoplasias mamárias, constata-se, com relativa frequência, a coexistência de padrões histológicos diferentes; em tais situações, o diagnóstico é comumente baseado no padrão mais severo (MISDORP *et al.*, 1999; EISENBERG & KOIFMAN, 2000).

A análise histopatológica de um tumor é essencial para obtenção de informações consistentes sobre os fatores prognósticos do câncer mamário, e deve ser considerado como um passo fundamental para a orientação terapêutica destas lesões (SCHMITT, 2000). Técnicas de imunoistoquímica para detecção de receptores de estrogênio, progesterona, fator de crescimento epidérmico, oncogenes, entre outros, são de grande valia na seqüência de obtenção de um prognóstico mais acurado em neoplasias mamárias. Entretanto, essas técnicas são muito dispendiosas e, conseqüentemente, não utilizadas na rotina veterinária. A análise histopatológica torna-se uma alternativa viável para se chegar a um significativo e efetivo prognóstico de tumores malignos em cães (FERREIRA *et al.*, 2003).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a classificação dos tumores é feita baseada sobre morfologia descritiva em acordo com o grau de malignidade. É sabido que, de acordo com o grau de malignidade, uma redução considerável da taxa de sobrevivência dos animais é observada (MISDORP *et al.*, 1999).

O grau histológico reflete a semelhança das células do tumor ao tecido original. Esta avaliação pode ser feita pelo grau celular geral ou pelo grau nuclear. A classificação geral ou celular leva em conta o grau de neoformação tubular, o pleomorfismo nuclear e a quantidade de figuras de mitose. A classificação de I a III é proporcional a indiferenciação do tumor, refletindo assim uma crescente piora no prognóstico. O grau nuclear é baseado na aparência do núcleo, não levando em consideração o padrão de crescimento do tumor. Aparentemente quanto mais indiferenciado o tumor maior será a resposta à quimioterapia e menores o

conteúdo de receptores hormonais. A avaliação quando feita por patologista experiente, se mostra um método auxiliar de grande valor em doença mamária (YAMAGAMI *et al.*, 1996; FRANCO, 1997).

A ordem crescente de malignidade, segundo a OMS é a seguinte: carcinoma “in situ” (não infiltrativo), carcinoma complexo (com envolvimento de células mioepiteliais), carcinoma tubulopapilar, carcinoma sólido e anaplásico (MISDORP *et al.*, 1999).

A tomografia computadorizada (TC) é, um método de diagnóstico por imagem que produz cortes seccionais de uma região do corpo por meio de armazenamento de informações em computadores e de raios X, com a vantagem sobre a radiografia convencional de apresentar grande sensibilidade em diferenciar pequenas atenuações dos raios X e ser isenta de sobreposição de estruturas. A utilização do exame tomográfico no estudo da cavidade torácica permite avaliação de campos pulmonares, mediastinais, pleuras e espaço pleural e parede torácica. Sua utilização na clínica médica veterinária é para detecção de linfadenopatias hilares ou mediastinais, pesquisa de nódulos pequenos e múltiplos, no direcionamento da aspiração com agulha fina de um nódulo quando a fluoroscopia não estiver disponível e para detecção precoce e mensuração de metástases pulmonares. Todavia, para utilização em animais, ela só está disponível em grandes centros de pesquisa tendo em vista os custos para aquisição e manutenção do equipamento. É o exame radiográfico indicado como meio de eleição para a investigação inicial da cavidade torácica dos animais e complemento fundamental ao exame físico em cadelas com tumor de glândulas mamárias (PINTO *et al.*, 2006).

Biologia molecular

Os principais alvos da alteração genética são os proto-oncogenes, os genes supressores tumorais e os genes que controlam a morte celular programada ou apoptose (DELFINO *et al.*, 1997). Acredita-se que os genes reparadores do DNA também possam papel de destaque na carcinogênese, pois qualquer

anormalidade nesses genes predisporia a mutações no genoma com subsequente transformação neoplásica (LOURO, 2000; COTRAN *et al.*, 2000).

Os fenômenos moleculares que acompanham a carcinogênese e os diversos eventos que caracterizam o comportamento maligno de uma neoplasia têm sido exaustivamente estudados. A interpretação e a adaptação destas informações têm sido úteis para a conduta clínico-oncológica, em particular, na doença neoplásica mamária. Isto se deve ao fato que o entendimento destes fenômenos têm esclarecido alguns aspectos dos mecanismos etiológicos e biológicos do câncer da mama, além de permitirem avanços consideráveis no diagnóstico e na terapêutica. Dentre estes fenômenos, estão os genes que regulam a apoptose (SAIKUMAR *et al.*, 1999; ZORNIG *et al.*, 2001).

Os proto-oncogenes são genes promotores do crescimento e da diferenciação celular que controlam a divisão mitótica ordenada das células (McKINNELL, 1998). Eles são transformados em oncogenes pelo descontrole da expressão dos genes ou pela mutação, translocação ou rearranjo dos genes, resultando na síntese de um produto anormal, as oncoproteínas (CARREÑO *et al.*, 1999).

A identificação de marcadores moleculares que possam predizer o comportamento dos tumores é especialmente importante em câncer de mama devido, sobretudo, à variabilidade na progressão clínica da doença. Alguns marcadores tumorais e suas relações com o prognóstico são discutidos, dando-se ênfase àqueles que utilizam, para sua detecção, o método imunoistoquímico e onde possa ser empregado material fixado em formol e embebido em parafina (material de arquivo). Os receptores hormonais (RH) são os menos polêmicos e os tumores positivos para estes marcadores, geralmente, apresentam menor tamanho, menor grau histológico e nuclear, uma melhor resposta à terapia hormonal e um melhor prognóstico. Para os outros marcadores tumorais aqui apresentados (c-erbB-2, catepsina D e E, MIB-1, PCNA, p53, caspase-3) existem muitas controvérsias, mas parte da literatura associa sua presença com tumores de alto grau histológico e com pior prognóstico. As divergências existentes na literatura são discutidas e chega-se a conclusão que mais estudos são

necessários antes que os marcadores tumorais possam ser utilizados como fatores prognósticos do câncer de mama (GAGO *et al.*, 1998; PEREIRA *et al.*, 2006).

Marcadores prognósticos

Os estudos têm focado vários indicadores prognósticos úteis na avaliação histopatológica do carcinoma da mama. Dentre eles, deve-se incluir, além dos aspectos histológicos convencionais, a presença ou não de metástases, a presença ou não de receptores hormonais, a expressão de genes oncogênicos e supressores, assim como a expressão dos fatores de crescimento e proliferação tumorais, inclusive a angiogênese (NARITA *et al.*, 1998; EISENBERG & KOIFMAN, 2000; FOULKES *et al.*, 2001; QUEIROGA & LOPES, 2002; CAVALCANTE *et al.*, 2006).

Dado a complexidade dos eventos no câncer, a avaliação de combinação de fatores prognósticos são de grande valia para os clínicos estimarem mais objetivamente o prognóstico individual de pacientes com câncer de mama (GAGO *et al.*, 1998).

A expressão exacerbada de *bcl-2* e *bcl-x (L)* associado com a diminuição da apoptose nas células de câncer de mama podem contribuir para formação de metástases (RUBIO *et al.*, 2001; ZORNIG *et al.*, 2001; FERNANDEZ *et al.*, 2002). Estudo avaliando o envolvimento do *bcl-2* na progressão de carcinomas mamários primários para metastáticos e sua influência no prognóstico, revelou a presença de *bcl-2* em 59% de carcinomas primários e 65% nos carcinomas mamários metastáticos, também houve concordância na expressão do *bcl-2* entre os sítios primários e metastáticos. A expressão do *bcl-2* foi associada significativamente com diversos aspectos prognósticos favoráveis, como menor tamanho tumoral e positividade para receptores de estrogênio e progesterona. O elevado índice apoptótico foi associado significativamente com vários fatores prognósticos desfavoráveis, incluindo carcinomas pouco diferenciados, maior tamanho tumoral, alta expressão de *Ki 67* e elevado índice de mitoses. A média do índice de

apoptose foi maior nos linfonodos com metástases que nos carcinomas primários. A baixa expressão do *bcl-2* e o elevado índice de apoptose foram significativamente associados com menores períodos sem reincidência (VILLAR *et al.*, 2001; FERREIRA *et al.*, 2003).

De modo geral, a imunodeteção do *p53* está relacionada à presença de necrose histológica; negatividade para receptores de estrógeno e associação com a variante de células grandes encontradas no componente intraductal (POLLER *et al.*, 1992; BERTAGNOLLI *et al.*, 2006). Em carcinomas ductais invasivos, a imunopositividade para a oncoproteína *p53* está relacionada a pior prognóstico, menor tempo de remissão da doença, graus histológicos II, III, negatividade para receptores de estrógeno e progesterona, alto índice de *Ki-67* e superexpressão de *c-erbB-2* (CLIN *et al.*, 1994; MUTO *et al.*, 2000). Dos tipos histológicos de carcinomas mamários invasivos, Domagala *et al.* (1993) observaram que a expressão da oncoproteína *p53* é muito mais freqüente em carcinomas medulares, seguidos de carcinomas ductais invasivos de grau III histológico, e, raramente, em carcinomas lobulares e carcinomas mucinosos. Em cadelas a expressão de *p53* foi mais alta nos tumores malignos e com maior intensidade naqueles menos diferenciados (CASSALI, 2000; BERTAGNOLLI *et al.*, 2006).

Tanto em medicina humana como na veterinária acredita-se que a molécula de adesão caderina-E tenha ação anti-invasiva no câncer de mama (OLIVEIRA *et al.*, 2004), desta forma o envolvimento dos linfonodos se faz importante fator prognóstico, mesmo assim existe grande variedade no resultado entre as pacientes linfonodo-positivo. A relação entre a expressão da caderina-E no CDI primário e no linfonodo-positivo correspondente, revelou expressão mais intensa nas metástases linfonodais, sugerindo que a expressão de moléculas de adesão no sitio metastático denota comportamento menos agressivo, melhor tempo de sobrevida (OLIVEIRA *et al.*, 2004; HARIGOPAL *et al.*, 2005).

A cadepsina total foi determinada por ELISA em 62 amostras de CDI da mama de mulher. Foi mais intensa em pacientes linfonodo-negativo que nas linfonodo-positiva, no estagio tumoral III que nos estágios I e II e nos tumores sem

receptores hormonais, quando comparado com tumores positivo para receptores hormonais (BUDIHNA *et al.*, 1995).

Outro estudo avaliando a correlação da localização imunoistoquímica entre a cadepsina-D (CD), PCNA e receptor do fator de crescimento epidermal (EGF-R) com os fatores prognósticos tradicionais como a graduação clínica e histológica, envolvimento linfonodal, índice de mitose, pôde-se observar em todas as amostras positividade de imunomarcção para a cadepsina-D no parênquima e no estroma dos carcinomas. PCNA e EGF-R mostraram positividade quase que exclusivamente no componente parenquimal do carcinoma. CD total correlacionou significativamente com a graduação histológica, PCNA (PI), índice de mitose, EGF-R e metástase linfonodal (OKAMURA *et al.*, 1997).

Estudo avaliando a importância prognóstica do c-erbB-2 e PCNA no câncer de mama, incluindo envolvimento de linfonodo, tamanho tumoral, graduação histológica e invasão linfática, revelou que o PCNA tem valor prognóstico independente em pacientes sem envolvimento de linfonodos, e c-erbB-2 e PCNA não são indicadores prognóstico independentes considerando todas as pacientes (KATO *et al.*, 2002).

A vascularização (WEIDNER, 1998) do tumor e a angiogênese (CRAFT & HARRIS, 1994; FOX *et al.*, 1995; GOED *et al.*, 1998; GRAHAM & MYERS, 1999; RESTUCCI *et al.*, 2000) têm papel muito importante no processo de metastização nos tumores mamários caninos, à semelhança do que acontece no câncer de mama da mulher (WEIDNER *et al.*, 1991; LOCOPO *et al.*, 1998; TOI *et al.*, 1999).

Estudo investigando a possível relação entre a expressão do fator de crescimento endotelial (VEGF) e fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) com fatores prognóstico tradicionais do câncer de mama e sítio metastático, revelou que a expressão de bFGF foi mais freqüentemente encontrada em tumores com baixa expressão de VEGF; assim como a elevada expressão de bFGF foi relacionada com tumores de menor tamanho e ausência de metástase para linfonodos caracterizando seu bom prognóstico e maior sobrevida das pacientes (LINDERHOLM *et al.*, 2003).

Com o objetivo de relatar a presença e o significado clínico da metalotionina (MT) no CDI primário da mama em mulheres, conclui-se que MT positivo (nuclear e citoplasmático) tem pior prognóstico que MT negativo, indicando maior agressividade e pouca diferenciação nas células tumorais (ZHANG *et al.*, 2000). Resultados semelhantes têm sido descrito em estudos com cadelas portadoras de câncer mamário (BREGUNCI *et al.*, 2003).

Nos carcinomas simples e complexo de mama canino a reação com o anticorpo anti-Tenascina mostrou intensa marcação do estroma em determinadas áreas das amostras tumorais, assim como no endotélio de vasos e também em algumas áreas ao redor dos ductos do tecido mamário, havendo áreas com ausência de marcação. A reação do anticorpo anti-Fibronectina, revelou marcação difusa por todo estroma, possuindo também marcação positiva no endotélio de vasos e na membrana basal dos ductos das glândulas (CASSALI *et al.*, 2001).

Estudo envolvendo figuras de mitose de fibroblastos nos CDI da mama também foi proposto ter importante papel na progressão do tumor. A atividade proliferativa destas células pode prever a formação de metástase para linfonodo ou a distância, e neste estudo indicou que a habilidade de formar metástase tem íntima dependência com a atividade proliferativa de fibroblastos na área interna dos carcinomas (HASEBE *et al.*, 2000).

A positividade para vimentina e p53 também foram relacionadas com pior prognóstico (MARIUZZI & SISTI, 1993).

Positividade para EGFR, super-expressão de PCNA e positividade para vimentina foram significativamente correlacionados com alto grau histológico e associado a carcinomas negativo para receptores de estrogênio. Uma tendência positiva foi observada entre tumores com alta proliferação e expressão de EGFR. O status do EGFR e índice do PCNA não foram correlacionados com o envolvimento linfonodal, tamanho tumoral e idade. A vimentina foi preferencialmente expressada em tumores com metástases em linfonodos, sugerindo ser importante para a predição de tumores biologicamente mais agressivos (KOUTSELINE *et al.*, 1995).

A relação da quantidade de micro vasos (MVQ) com PCNA, c-erbB-2 e cadepsina D no CDI de mama foi estudado para determinar seu valor prognóstico, sendo positivamente relacionada com a expressão de cadepsina D (células estromais), PCNA e metástase a distancia, podendo ser um indicador prognóstico independente (CHENG *et al.*, 1997).

Tamanho tumoral, expressão positiva para receptores de estrógeno e linfonodo positivo não foram significativamente diferentes entre os tipos histológicos de carcinoma ductal invasivo (CDI) e carcinoma lobular invasivo (CLI). Pacientes com CLI apresentaram mais freqüentemente tumores menos agressivos e menor invasão vascular no tumor primário que nos CDI (MERSIN *et al.*, 2003).

Proliferação

O crescimento celular resulta da ação de vários fatores estimuladores ou inibidores da divisão celular produzidos no meio intra ou extracelular (MAREEL & LEROY, 2003). O controle do crescimento celular depende da expressão de vários genes, principalmente daqueles que codificam os fatores de crescimento e seus receptores (McKINNELL, 1998; CARREÑO *et al.*, 1999).

A compreensão dos mecanismos moleculares envolvendo o controle do crescimento das células neoplásicas pode identificar os fatores do processo regulatório, contribuindo para o entendimento dos mecanismos envolvidos na progressão do tumor (GOMPEL *et al.*, 2001; KAUFMANN & HENGARTNER, 2001; OBERLEY, 2002). Desta forma, a utilização de técnicas adequadas, servirá como recurso auxiliar para um diagnóstico mais preciso, tornando o prognóstico mais favorável, propiciando o estabelecimento de terapias mais apropriadas, procedimentos clínicos e cirúrgicos adequados, além de um controle sobre recidivas das neoplasias mamárias bem como de suas metástases.

Os oncogenes e seus produtos podem aumentar a expressão dos genes das ciclinas e das quinases ciclina-dependentes (CDK), responsáveis pela progressão ordenada das células nas diversas fases do ciclo celular (PINES, 1995; McKINNELL, 1998). No ciclo normal, quando a célula recebe sinais

promotores para seu crescimento, a síntese de ciclinas *D* e *E* é estimulada na fase *G1*. A progressão das células da fase *S* para a fase *G2* é facilitada pelo controle da ciclina *A* ligada a *CDK2* e *CDK1*. O papel exato da ciclina *A* não é conhecido, mas evidências sugerem que ela seja indispensável para a replicação do DNA (PINES, 1995). No início da fase *G2* predomina a ciclina *B* que, ao formar complexos com *CDK1*, auxilia a passagem da célula para a fase *M* e fosforila proteínas necessárias para a mitose. As mutações que descontrolam a atividade das ciclinas e das *CDK* favorecem a proliferação celular (COTRAN *et al.*, 2000).

Dentre os genes supressores tumorais, estão aqueles que regulam a transcrição nuclear e o ciclo celular (*Rb*, *p53*, *BRCA-1*, *BRCA-2*), os genes que regulam a transdução de sinais (*NF-1*, *APC*) e os receptores da superfície celular (receptor do *TGF- β* e caderinas) (DENG & BRODIE, 2001). A *pRb*, produto do gene *Rb*, é uma fosfoproteína nuclear expressa em todos os tipos celulares, que em sua forma ativa, inibe a progressão das células da fase *G1* para a fase *S* do ciclo celular (LOURO, 2000).

O gene *p53*, denominado guardião do genoma, produz uma proteína que controla a replicação do DNA, a proliferação celular e a apoptose. Nas células com DNA alterado, a proteína *p53* acumula-se no núcleo e liga-se ao DNA evitando sua replicação (MUTO *et al.*, 2000).

Essa parada no crescimento celular na fase *G1* permite à célula restaurar seu genoma (COTRAN *et al.*, 2000). Entretanto, danos irreversíveis requerem a eliminação das células acometidas (PINES, 1995).

Os genes *BRCA-1* e *BRCA-2* são supressores tumorais. A função desses genes não é totalmente conhecida, mas acredita-se que estejam envolvidos no controle da transcrição (COTRAN *et al.*, 2000). Mutações nesses genes predisõem ao desenvolvimento do câncer de mama, ovário, próstata, cólon, pâncreas e de laringe (DENG & BRODIE, 2001; INGVARSSON, 2001).

Os produtos dos genes *NF-1* e do gene *APC* também são supressores tumorais (COTRAN *et al.*, 2000). A proteína *APC* localiza-se no citoplasma e degrada a catenina, proteína que pode penetrar no núcleo e ativar a transcrição dos genes promotores do crescimento. Assim, mutações no gene *APC* estimulam

a proliferação celular (COOPER, 1995). A neurofibromina, produto do gene NF-1 regula a transdução de sinais pela proteína *ras* e ativa a GTPase, enzima que facilita a conversão da proteína *ras* ativa em *ras* inativa.

Com a mutação ou perda do gene NF-1, a proteína *ras* é mantida no seu estado ativo, estimulando também a proliferação celular (PERATONI, 1998).

Vários tipos de moléculas expressas na superfície celular podem controlar o crescimento e o comportamento da célula, tais como os receptores do TGF β que regulam a transcrição dos genes inibidores do crescimento e as proteínas que regulam a adesão celular representadas pelas caderinas (LOURO, 2000).

Existe correlação positiva entre a agressividade do câncer, evidenciada pela menor sobrevida do paciente, e mutações nos gene CDH1 que codifica as caderinas (MAREEL & LEROY, 2003).

Os genes que impedem (Bcl 2, Bcl-XL) ou induzem (Bax, Bad) à morte celular programada também são importantes na carcinogênese. O primeiro gene inibidor da apoptose descrito foi o bcl-2 (LOURO, 2000). A inibição da apoptose pelo bcl-2 pode ocorrer em qualquer estágio do ciclo celular, porém os mecanismos envolvidos ainda não foram totalmente elucidados. Postula-se que o bcl-2 aumente o tempo de sobrevida das células, favorecendo a atuação de outros oncogenes sobre elas (DELFINO *et al.*, 1997).

O antígeno nuclear de células em proliferação (PCNA) e o antígeno nuclear Ki-67, podem ser usados pelo método imunoistoquímico para avaliação da proliferação celular. O PCNA aparece no núcleo das células durante o estágio tardio da G1 para a fase S do ciclo celular e está intimamente relacionado com a proliferação celular, com isto esta molécula vem sendo bastante estudada em medicina humana e ainda pouco na veterinária (NARITA *et al.*, 1993).

Com o objetivo de correlacionar a expressão imunoistoquímica do p53 e PCNA com parâmetros prognósticos no carcinoma mamário, evidenciou o máximo de positividade nos tumores de grau III, caracterizando que a expressão do p53 e PCNA são marcadores de células pouco diferenciadas no câncer de mama (GOEL *et al.*, 2000).

Nos cães os índices proliferativos foram significativamente menores em tumores não malignos e displasias que em tumores malignos. Nos cânceres a expressão do PCNA foi positivamente correlacionada com o grau de malignidade histológico e graduação nuclear. Valores elevados de Ki-67 foram positivamente correlacionados com metastases e morte pela neoplasia (PENA *et al.*, 1998; MORENA *et al.*, 2004).

Utilizando a técnica de imunoistoquímica para diferenciar a expressão do PCNA em lesões benignas e malignas no câncer de mama nas mulheres, concluiu-se que os carcinomas apresentam maior índice proliferativo que fibroadenomas e lesões fibrocísticas da mama (KALOGERAKI *et al.*, 1994; NARITA *et al.*, 1993).

O tipo comedo do carcinoma ductal invasivo e carcinoma intraductal apresentam maiores índices de PCNA que outros tumores. As metástases para os linfonodos também apresentaram maiores índices de PCNA que no tumor primário. Elevada imunomarcagem foi relacionada com a presença de metástase para linfonodo, ausência de formação tubular, figuras de mitose, anisocariose, alto grau histológico e ausência de receptores para progesterona. PCNA em tumores linfonodo-positivo foi correlacionado com o tipo de tumor, especialmente com o carcinoma ductal, ausência de formação tubular, alto grau histológico e ausência de receptores para progesterona, enquanto que PCNA em tumores linfonodo negativo foi relacionado com maior tamanho tumoral, figuras de mitose, anisocariose e alto grau histológico (CUMMINQS *et al.*, 1993; HAERSLEV & JACOBSEN, 1994).

A proliferação celular foi avaliada em 167 amostras de câncer de mama primário de pacientes que se submeteram à cirurgia radical. Não houve diferença entre o índice de PCNA e tamanho tumoral, envolvimento de linfonodos e receptores hormonais. 146 carcinomas invasivo mostraram que o grupo com elevados níveis tiveram menor sobrevida comparado com o grupo de menores expressões de PCNA (HORIKUCHI *et al.*, 1998).

Amostras de material de arquivo (parafina) foram imunocoradas com anticorpo monoclonal contra PCNA, evidenciando expressão baixa (<25%),

intermediária (25-50%) e elevada proliferação (>50%). O índice de proliferação nas pacientes com alta expressão de receptores para estrógeno foi significativamente menor que as pacientes com baixas expressões para receptores hormonais (estrógeno). Com relação ao tipo histológico, o índice de proliferação do carcinoma esquirroso foi menor que nos carcinomas tubulopapilíferos ou tubular sólido (HORIKUCHI *et al.*, 1994).

Outro método utilizado na mensuração da cinética do ciclo celular no câncer de mama é o Citômetro de Fluxo. Tem servido para estimar a fração proliferativa de tumores incluindo análises da composição do DNA com determinação da fase S. Carcinomas apresentam expressões mais elevadas que o tecido normal adjacente, e as metástases dos linfonodos tem pouco mais expressão que seus respectivos tumores primários. Os níveis de PCNA não tiveram correlação com idade, tamanho tumoral, envolvimento linfonodal, invasão linfática intramamária e receptores hormonais. PCNA foi associado com menor sobrevida comparado com tumores com baixa expressão de PCNA (TAHAN *et al.*, 1993).

Avaliou-se o significado prognóstico do PCNA em pacientes com metástase em linfonodo, evidenciando menor sobrevida das pacientes com superexpressão do PCNA, garantindo seu potencial como importante marcador prognóstico nos carcinomas metastáticos para linfonodos (SHEEN-CHEN *et al.*, 1997).

Biópsias de 175 tumores primários foram submetidas a imunorreação para PCNA e análise histopatológica para caracterização de fatores prognóstico, todas elas de mulheres com cancer de mama sendo acompanhadas durante nove anos. No epitélio normal mamário, apenas ocasionalmente o núcleo foi positivo para PCNA. Nos carcinomas, as frações de núcleos positivos para PCNA mostrou considerável variação intratumoral, frequentemente mais expressiva para as margens invasivas do tumor. Os resultados mostraram que o microscópio de luz auxilia na determinação da fração de crescimento pela imunomarcagem do PCNA e tem valor prognóstico independente no carcinoma mamário, assim como outros previamente caracterizados como índices de proliferação (AALTOMAA *et al.*, 1992).

A investigação entre PCNA e várias características clinico-patológicas e seu valor prognóstico no carcinoma mamário mostrou que não existe correlação com as variáveis clinico-patológicas e sobrevida das pacientes portadoras de cancer de mama (THOMAS *et al.*, 1993).

De acordo com a graduação histológica, baixa expressão de PCNA esta realcionado com grau I, 26% de células tumorais mostraram positividade nuclear para PCNA, seguido pelo grau II (30%) e III (33%), mostrando sua significativa correlação com a diferenciação histológica. Metástase a distancia foi encontrada em mais de 25% dos casos positivos. Neste estudo PCNA provou ser indicador prognóstico independente em dizer a sobrevida da paciente (AZIZ *et al.*, 2005).

A expressão total do PCNA aumenta significativamente com o aumento da graduação tumoral. Existe nítida correlação entre o índice de proliferação do tumor primário e sua metástase para os linfonodos regionais, mas a atividade proliferativa nas metástases foi significativamente menor que no tumor primário (OKAMURA *et al.*, 1997).

Apoptose

A apoptose pode ser iniciada por varios sinais externos e internos e executada entre varias vias de sinalização inter-relacionadas. Em níveis moleculares, o processo de morte celular forma uma complexa cascata de eventos ordenados, controlados pela expressão regulada de genes e proteínas associados a apoptose. É devido à ação planejanda em conjunto destes componentes que finalmente resulta no desmantelamento celular e formação de corpos apoptóticos (SHAO *et al.*, 1996).

A ativação do processo de apoptose é um ponto discutível para muitos pesquisadores, principalmente de seus mecanismos iniciais de ação (KAUFMANN & HENGARTNER, 2001).

Apoptose é morfollogicamente e bioquimicamente uma forma distinta de morte celular programada que ocorre sobre uma variedade de condições fisiológicas e patológicas (ALTUCCI & GRONEMEYER, 2001; KAUFMANN & HENGARTNER,

2001; SOUZA *et al.*, 2006). Pôr se tratar de um processo regulado, controlado por uma diversidade de sinais extras e intracelulares, a apoptose é usada para coordenar a morte, subsequente à agressão ou dano às células somáticas. Além disso, a apoptose inclui mecanismos que organizam e ordenam o processo na célula apoptótica, prevenindo a inflamação do tecido circundante. Doenças relacionadas com supressão da apoptose incluem câncer, formação de metástase tumoral, doenças autoimune e infecções virais (SHAO *et al.*, 1996; LIU *et al.*, 2001).

No contexto de mecanismo homeostático na regulação da população celular animal, a apoptose apresenta papel complementar, porém opositor à proliferação celular. São essenciais para o desenvolvimento do animal na fase inicial, permanecendo também na fase adulta. Nos animais adultos, a morte celular contrabalança a proliferação celular, mantendo a constância da massa tecidual. A remoção de células injuriadas por defeitos genéticos, senilidade, doença, ou exposição a agentes nocivos é possível pelo processo da apoptose. Mais ainda, a resposta imunológica normal requer eliminação regulada de populações celulares específicas por este tipo de morte celular (SAIKUMAR *et al.*, 1999).

Apoptose têm importante papel biológico no desenvolvimento e homeostasia da população celular, como também na patogênese de processos patológicos. O excesso e deficiência da apoptose contribui para uma variedade de doenças como no envolvimento da progressão e regressão de tumores. Os avanços no conhecimento deste processo são estimados pela identificação de “death genes” há uma década atrás (SHAO *et al.*, 1996).

Uma célula em apoptose pode ser identificada pelos exames histopatológico, de acordo com as características morfológicas típicas, e mediante técnicas imunoistoquímicas, utilizando marcadores específicos (SAIKUMAR *et al.*, 1999; ALTUCCI & GRONEMEYER, 2001; LIU *et al.*, 2001).

Os componentes chave nesta auto-destruição são os membros da família das *caspases*. Além disso, pode-se concluir que o mitocôndria tem grande importância em determinar quando a célula irá entrar no caminho da apoptose (KAUFMANN & HENGARTNER, 2001).

As *caspases* estão todas implicadas na regulação e execução da apoptose. São proteoliticamente processadas para sua forma ativa, compostas de resíduos catalíticos de cisteína e determinantes que controlam a especificidade de substratos (SCHMITZ *et al.*, 2000; ALTUCCI & GRONEMEYER, 2001). Estes substratos são agrupados em diferentes classes de acordo com sua função. Entre estas, estão as proteínas pró e anti-apoptóticas (KAUFMANN & HENGARTNER, 2001).

Há duas famílias de *caspases*, de acordo com o comprimento de seu domínio terminal NH₂. As *caspases* 1, 2, 4, 5, 8, 9 e 10 têm longos domínios e tem função em regular a apoptose. *Caspases* 3, 6 e 7 têm domínios curtos e são responsáveis pela execução da apoptose. A caspase 3 é a executora terminal, essencial para as alterações nucleares associadas a apoptose (ZORNIG *et al.*, 2001).

As *caspases* podem ser divididas de acordo com suas funções. O primeiro grupo, o qual está implicado na maturação das citocinas incluem a *caspase* 1, 4, 5 e 14 (LOS *et al.*, 2003). O segundo grupo, que envolvem as *caspases* 2, 3, 6, 7, 8, 9 e 10, que estão literalmente implicadas na apoptose. O mecanismo de apoptose é executado por uma cascata de ativação seqüencial de *caspases* iniciadoras e efetoras. As iniciadoras, que incluem as *caspases* 2, 8, 9, 10 e 12, apresentam longos prodomínios com reconhecimento da interação homotípica proteína-proteína, como os domínios efetores da morte (DED) ou do recrutamento do domínio das *caspases* (CARD) que contribuem com a transdução de vários sinais para a atividade proteolítica. As duas principais funções das *caspases* iniciadoras (8 e 9) é distinguir as vias a qual culmina na ativação do principal efetor a procaspase 3. *Caspase* 3, 6 e 7 são sabidamente *caspases* efetoras, são responsáveis pela clivagem da maioria dos substratos apoptóticos já conhecidos, como o fator fragmentador de DNA 45 (DFF 45), poli- (ADP-ribose) polimerase (PARP), sendo todas estas caracterizadas com a apoptose nuclear (KAUFMANN & HENGARTNER, 2001).

Após exposição de uma célula aos estímulos apoptóticos, o *citocromo c* é liberado da mitocôndria ao citosol, o qual representa um dos vários fatores

implicados na ativação proteolítica da *caspase-3* pela *caspase-9* (*Apaf-3*) (SAIKUMAR *et al.*, 1999; ZORNIG *et al.*, 2001). Bioquimicamente, foram identificadas duas proteínas citoplasmáticas, *Apaf-1* e *Apaf-3*, que junto ao *citocromo c* formam um complexo, que ativará a *caspase-3* (HUANG & OLIFF, 2001).

Por outro lado, todos esses fatores pró-apoptóticos sofrem a influência dos fatores *bcl-2/bcl-x (L)*, localizados na membrana mitocondrial externa. O *bcl-2* bloqueia a apoptose tanto bloqueando a liberação do *citocromo c* como se ligando ao *Apaf-1* prevenindo a ativação da *caspase 9*. Alternativamente, membros pró-apoptóticos da família *bcl-2*, como *Bax*, *Bak* e *Bik*, promovem a apoptose deslocando *Apaf-1* do *Bcl-2/x (L)* (OWUOR & KONG, 2002).

De um modo global a regulação da apoptose pode ser exemplificada pela ação do *p53* que pode diminuir a expressão dos níveis de *bcl-2* e aumentar os níveis do *Bax*. O *Bax* é liberado para a membrana mitocondrial, com conseqüente liberação do *citocromo c* para o citoplasma, ativando a cascata das *caspases*, responsáveis pela quebra de proteínas importantes no núcleo e citoesqueleto. Estas alterações conduzem para os últimos passos da apoptose e das alterações morfológicas características desta fase. Assim, a apoptose pode ser caracterizada pela fragmentação do DNA e por corpos apoptóticos. Outro mecanismo possível de suprimir a apoptose pelo *Bcl-2* surgiu da observação que sua expressão pode afetar a homeostasia intracelular de Ca^{+2} (ZORNIG *et al.*, 2001).

O processo de apoptose pode ser induzido por uma variedade de estímulos, incluindo a ativação de receptores de membrana como *TNF/NGF*, incluindo integrantes de sua superfamília (*Fas*) que são capazes de ativar as *caspases* (SCHMITZ *et al.*, 2000; SUYAMA *et al.*, 2002).

Elevados níveis de apoptose foram significativamente associados com fatores prognósticos desfavoráveis, incluindo carcinomas pouco diferenciados, maior tamanho tumoral, elevados níveis de expressão ki 67 e elevados índices de mitose. A média dos índices apoptóticos foi maior nos linfonodos metastáticos que no carcinoma primário. Desta forma foi fortemente associado com a progressão do carcinoma primário para a metástase ganglionar (VILLAR *et al.*, 2001).

A presença de altos níveis de apoptose foi associado com aumento da proliferação celular, negatividade para estrógeno, imuno-positividade para erbB-2 e p53, e menor sobrevida. Apoptose não provou ter valor prognóstico independente em ambos, linfonodo positivo ou linfonodo negativo (LIU *et al.*, 2001).

Qualquer descoberta é importante para a criação de novas terapias e métodos de prevenção, que poderão evitar ou tratar com sucesso inúmeras doenças hoje incuráveis.

Tratamento

Para as neoplasias mamárias em fêmeas da espécie canina, a mastectomia constitui a terapia de escolha, com exceção dos carcinomas inflamatórios e as metástases à distância (WITHROW & MacEWEN, 1996).

Além de conhecer os fatores etiológicos oncogênicos é de fundamental importância para a prevenção que o médico veterinário oriente o cliente no que refere-se à profilaxia neoplásica; - as exérese neoplásicas com amplas margens de segurança combinadas com quimioterapia antineoplásica, constituem opções terapêuticas para prolongar a sobrevida de cães acometidos por tumores mamários (HENDERSON *et al.*, 1991; MORRIS *et al.*, 1998; PERATONI, 1998; FERREIRA *et al.*, 2006).

O estudo da apoptose e do câncer está começando a esclarecer por que muitos tumores resistem à radioterapia e à quimioterapia. Pensava-se que tais terapias destruíam o tumor por necrose, mas agora sabe-se que as células morrem em geral por apoptose. O que parece ocorrer é que tanto a radiação quanto as drogas danificam o DNA das células cancerosas, ativando o gene p53 e levando ao “suicídio” celular. Mas células cancerosas sem a p53 ou com altos níveis de Bcl-2 não morrem, tornando inúteis essas terapias (MUTO *et al.*, 2000).

Indicadores moleculares no câncer mamário em cadelas SRD

Com o avanço dos estudos moleculares, são grandes os progressos oferecendo novas perspectivas para se conhecer melhor a gênese e evolução do câncer da mama. A expressão histoquímica e imunoistoquímica são habitualmente utilizadas para designar aqueles setores da histologia que permitem a identificação e a localização de compostos químicos específicos nos tecidos e células respectivamente. A grande maioria deles se baseia na produção de reações coradas, desenvolvidas em cortes de tecidos entre a substância pesquisada e o reagente utilizado. Apesar dessa aparente simplicidade, estes dados são escassos em Medicina Veterinária. Mais ainda, o uso associado desses indicadores em câncer de mama de cadelas SRD, são até o momento inexistentes. Assim, essa proposta contribuirá não só no aspecto clínico-epidemiológico, como também de documentação molecular do câncer mamário de cadelas, com grande potencial para entendimento deste modelo experimental para estudos humanos.

Este estudo foi realizado para investigar o papel do índice de apoptose como parâmetro para prognóstico de cadelas SRD com carcinoma mamário. Foi determinado pela expressão de caspase-3 e comparadas com parâmetros clínicos tradicionais do cancer de mama. Adicionalmente foi determinado a expressão de parâmetros funcionais incluindo PCNA.

OBJETIVOS

Gerais

- Associar o índice de proliferação celular e de apoptose pela imunomarcção de células positivas para PCNA e caspase-3 com a classificação histopatológica e estadiamento clínico das neoplasias mamárias em cadelas sem raça definida.

Específicos

- Associar alterações de marcadores de proliferação e apoptose no tumor primário e na metástase pulmonar;
- Associar as características clínicas do câncer de mama com o comportamento proliferativo e apoptótico avaliados pela técnica imunoistoquímica.

MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes

Dentre os animais atendidos no serviço de Patologia, foram selecionadas 40 cadelas, sem raça definida (SRD), de diferentes faixas etárias, agrupadas em quatro grupos de 10 animais cada, classificados pelo TNMc em grupos no estágio I, II, III e IV da doença. O critério de inclusão foi baseado na suspeita de neoplasia mamária confirmada pelo Serviço de Patologia mediante o exame clínico completo e diagnóstico histopatológico. Foram obtidas junto aos seus respectivos proprietários, as histórias detalhadas e, em particular, as características relacionadas ao ciclo estral e reprodução dos animais.

Para a realização deste estudo foram obedecidas as normas éticas exigidas pela Câmara de Ética em Experimentação Animal – CEEA protocolo nº 29/99 e incluiu a obtenção do consentimento esclarecido de cada proprietário.

Análise microscópica

Para a realização deste estudo desenvolveu-se protocolo para a coleta sistematizada dos dados do exame histopatológico e resultado. O protocolo foi adaptado seguindo as referências de FERREIRA *et al.*, 2003a.

A leitura do material foi realizada em microscópio de luz, seguindo os critérios: 100x para avaliação da celularidade e qualidade da coloração; 200x para as características dos tipos celulares; e, por fim, o aumento de 400x para análise morfológica individual das células (características nucleares e citoplasmáticas).

Análise clínica

Após a confirmação do diagnóstico para malignidade, o laudo foi encaminhado, como procedimento de rotina, para o profissional (clínico/cirurgião/proprietário) responsável pelo caso. Os animais foram

identificados em fichas próprias, elaboradas para realização deste estudo. Nestas fichas foram registrados os dados de identificação do animal, o histórico e o exame clínico. O histórico dá ênfase ao comportamento reprodutivo (cios, gestações, aborto e uso de anticoncepcionais), visto que o envolvimento hormonal é a hipótese que tem conseguido maior confirmação junto aos pesquisadores e clínicos (Anexo A).

Como meio de classificação da altura do animal, utilizou-se o método aplicado pela Confederação do Brasil Kennel Clube (CBKC, 1987), obtido pela mensuração da distância entre o solo e a cernelha, permanecendo o animal em posição quadrupedal. Desta forma aplicou-se como base às normas existentes para os cães com raça definida, utilizando-se a altura limite até 35cm para porte pequeno, 36-46cm para porte médio e acima de 46cm para porte grande.

A análise da condição corporal seguiu a metodologia aplicada em estudo anterior, para a avaliação da composição corporal e achados físicos, por meio da visualização e um simples exame físico (BURINI, 2002).

Classificação clínica da neoplasia

Após a confirmação do câncer mamário e caracterização do quadro clínico, foi realizado o estadiamento clínico da doença utilizando-se o sistema TNM-clínico (Tumor-Linfonodo-Metástase) para câncer de mama, elaborado pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Tem como base a dimensão do tumor (T), a avaliação da extensão aos linfonodos (N) e a presença ou não de metástases à distância (M). Após a avaliação destes fatores, os casos foram classificados em estágios que variam de I a IV graus crescentes de acordo com a gravidade da doença (Quadro 1) BRASIL, 1998.

Nos casos de multicentricidade utilizou-se o diâmetro do maior tumor e em casos de tumores bilaterais apenas o tumor com estágio mais avançado foi considerado.

A classificação pelo TNM-clínico (MISDORP *et al.*, 1999) tem como base os seguintes critérios:

T= Tamanho ou Extensão Tumoral (maior diâmetro do tumor primário)

Tx – tumor primário não pode ser avaliado

T0 – nenhuma evidência de tumor primário

TIS – carcinoma *in situ* ou doença de Paget do mamilo sem tumor adjacente

T1 – 2 cm ou menos

T2 - > 2,0 até 5,0 cm

T3 - > 5,0 cm

T4 – qualquer tamanho de tumor com extensão direta para parede torácica ou abdominal ou pele

T4a – extensão à parede torácica

T4b – edema, ulceração da pele ou nódulos cutâneos satélites confinados à mesma mama

T4c = T4a + T4b

T4d – carcinoma inflamatório

N = Envolvimento Linfonodal

Nx – linfonodos regionais não podem ser avaliados

N0 – ausência de metástases para linfonodos regionais

N1 – metástases para linfonodos regionais ipsilaterais móveis

N2 - metástases para linfonodos regionais ipsilaterais fixos (linfonodos fixos uns aos outros ou fixos a outras estruturas)

N3 – metástases para linfonodos da cadeia mamária interna ipsilateral

M = Metástase à Distância

Mx – metástases não podem ser avaliadas

M0 – não existem metástases

M1 – presença de metástases à distância

Quadro 1 - Estadiamento clínico pela classificação TNM (MISDORP *et al.*, 1999).**Estadiamento clínico**

Estadiamento	Tamanho	Linfonodo	Metástase
Estádio 0	TIS	N0	M0
Estádio I	T1	N0	M0
Estádio IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Estádio IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
	T0	N2	M0
Estádio IIIA	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
	T4	*qqN	M0
Estádio IIIB	*qqT	N3	M0
	qqT	qqN	M1

*qqT- qualquer tamanho

*qqN- qualquer envolvimento linfonodal

Análise histopatológica

Foram selecionadas 40 amostras de carcinoma primário das cadelas divididas em quatro grupos de acordo com o estágio da doença, adicionalmente foi processada amostra das respectivas metástases pulmonares dos animais no estágio IV.

Para análise histopatológica foram realizados procedimentos rotineiros para o processamento da amostra em blocos de parafina, preparação de lâminas e posterior coloração por Hematoxilina e Eosina (H&E).

As neoplasias foram classificadas segundo a descrição histológica para tumores mamários em caninos recomendados atualmente pela Organização Mundial de Saúde. As características utilizadas para pontuação e soma dos escores para posterior classificação conforme o grau de malignidade estão descritos no Quadro 2.

Quadro 2 – Características utilizadas para classificação de tumores mamários de cadelas conforme o grau de malignidade.

Características	Escore
1. Formação de túbulo: um ponto para formação de túbulos bem marcada; três pontos para pouco ou nenhuma túbulo	1 2 3
2. Hiperchromatismo e mitoses: um ponto se uma figura mitótica é vista ocasionalmente; dois pontos se duas ou três figuras são vistas; três pontos se o número é alto	1 2 3
3. Tamanho e forma irregular do núcleo: um ponto se os núcleos são proporcionais em tamanho e forma, três pontos quando o pleomorfismo é marcado.	1 2 3
<u>Total do escore</u>	<u>Grau de malignidade</u>
3-5	I
6-7	II
8-9	III

Fonte: Misdorp, 1999

Por outro lado, foi proposto outro sistema classificatório, os quais se baseiam em classificação histológica descritiva, que também contemplaria o fator prognóstico da neoplasia avaliada. Isto se deve a resultados conflitantes entre carcinomas compostos por componentes exclusivamente epiteliais (Tipo simples) e carcinomas com envolvimento de células mioepiteliais (Tipo complexo), neste último inclui as neoplasias com elementos heterólogos como formações ósseas e cartilaginosas.

Análise imunoistoquímica

Efetuuou-se a análise imunoistoquímica de 50 amostras de câncer de mama (40 tumores mamários primários e em 10 casos suas respectivas metástases pulmonares). As 10 metástases pulmonares são dos animais no estágio IV da doença.

Para realização da técnica de imunoistoquímica, os blocos de parafina foram novamente cortados em micrótomo com espessura de três μm e distendidos em lâminas histológicas previamente preparadas com Organsylane (Sigma-Aldrich A3648) com o intuito de promover maior aderência dos cortes às lâminas, evitando a perda do material durante o procedimento imunoistoquímico. As lâminas foram estocadas em estufa com temperatura entre 55 e 58°C por 24 horas, e transferidas para cubas de vidro vertical para iniciar a técnica.

A técnica de imunoistoquímica seguiu o protocolo do Laboratório de Imunoistoquímica do Serviço de Patologia da FMVZ – UNESP – Botucatu.

A desparafinização foi realizada com dois banhos em xilol de 30 minutos cada em temperatura ambiente.

O processo de desidratação foi realizado com passagens em álcool absoluto (três vezes de três minutos), álcool 95° e álcool 85°.

Iniciou-se então a recuperação antigênica, com o propósito de liberar os epítomos antigênicos do tecido, bloqueados pela solução fixadora (formol tamponado a 10%). Este processo variou conforme o anticorpo primário a ser empregado. Solução de citrato pH 6,0 foi previamente aquecida a 97°C em banho Maria, em seguida as lâminas foram colocadas na solução e permaneceram nesta mesma temperatura por trinta minutos. Após o término desta fase as lâminas foram deixadas em temperatura ambiente durante vinte minutos para arrefecimento, sendo posteriormente lavadas com água destilada.

A fase seguinte consistiu do bloqueio da peroxidase endógena por imersão das lâminas em uma solução de peróxido de hidrogênio 10 volumes por 20 minutos. Em seguida o material foi lavado em água destilada e banhado duas vezes, de cinco minutos cada, em solução de TRIS (10mM pH7,4).

O material foi incubado durante uma hora com BSA 1% no intuito de reduzir a coloração de fundo. Então, os anticorpos primários foram diluídos em solução de BSA 1%, sendo em seguida aplicados às amostras, e estas incubadas em câmara úmida por 18 horas (*“over-night”*) à temperatura de 4°C (Tabela 1).

Tabela 1- Anticorpos primários utilizados, tipo de marcação, marca e diluições padronizadas.

Anticorpo primário	Tipo de marcação	Clone	Marca	Diluição padronizada
Caspase-3	Nuclear	ASP175	Cell Signing	1:200
PCNA	Nuclear	PC10	Dako	1:50

O controle negativo para proteínas inespecíficas foi realizado substituindo-se o anticorpo primário por BSA 1% (o mesmo utilizado na diluição dos anticorpos). Como controle negativo específico, substituiu-se o anticorpo primário monoclonal ou policlonal por imunoglobulinas produzidos em camundongo¹ e em coelho², respectivamente.

Para diminuição das reações inespecíficas dos anticorpos secundários, na reação com o anticorpo primário anti-caspase-3 clivada, utilizou-se ainda soro normal de cabra³ antes da incubação dos anticorpos primários.

Após este período procedeu-se a lavagem das amostras em solução de TRIS (dois banhos de cinco minutos cada), a incubação com anticorpo biotilado e posteriormente com a solução streptavidina-peroxidase, ambas do kit LSAB⁴, por 30 minutos cada reação, em câmara úmida, à temperatura ambiente. Entre as duas reações e ao final da segunda lavaram-se as amostras com TRIS por duas vezes de cinco minutos cada. Utilizou-se ainda, para o anticorpos primário anti-

¹ Negative Control Mouse, Dako Cytomation, cod. N1698, Via Real, Carpinteria, CA, USA

² Negative Control Immunoglobulin, Dako Cytomation, cod. X0903, Carpinteria, CA, USA

³ Goat Serum (Normal), Dako Cytomation, cód. X0907, Via Real, Carpinteria, CA, USA

⁴ Dako cód. K0690

caspase 3 clivada, o sistema de visualização EnVision Dual Link⁵ composto por um polímero ligado ao anticorpo secundário e à peroxidase, compatível com anticorpos primários produzidos em camundongos (monoclonais) e em coelhos (policlonais). O produto foi aplicado sobre os cortes onde permaneceu por 30 minutos, após este período o material seguiu o mesmo protocolo utilizado para o kit LSAB.

Para visualização da reação, os cortes foram cobertos com cromógeno (DAB líquido+)⁶, preparado no momento do uso, durante cinco a trinta minutos, a depender do anticorpo primário, e logo depois banhados em TRIS, para a interrupção da reação, e então lavados em água destilada por dez minutos.

As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Mayer por um minuto, lavadas em água corrente por dez minutos, passadas uma vez em água destilada e desidratadas. Esta etapa consistiu-se de uma passagem em álcool 85°, uma em álcool 95°, três em álcool absoluto e três em xilol, cada etapa durando cinco minutos. Cobriram-se as lâminas com lamínulas, aderindo-as com resina sintética Permount⁷.

Avaliação da imunorreatividade

A imunorreatividade para PCNA e caspase-3 foi considerada quando a marcação ocorria no núcleo celular e com intensa reação. Em cada preparação foram contabilizados os núcleos positivos num total de 300 células, selecionando-se para contagem as áreas com imunorreatividade mais intensa e homogênea.

As contagens foram efetuadas em analisador de imagem, sempre pelo mesmo observador e com a objetiva de 40x, estabelecendo-se em seguida a percentagem de núcleos positivos (índice de proliferação (IP) do PCNA e índice de apoptose (IAPOP) da caspase-3).

A determinação do índice proliferativo (IP) e índice de apoptose (IAPOP) consistiram do percentual de células com marcação nuclear positiva para PCNA e

⁵ Dako cód. K4061

⁶ Dako cód. K3468-1

⁷ Fisher Scientific cód. SP15-500

caspace-3 em 300 células epiteliais contadas nos focos de carcinoma mamário para cada anticorpo, por lâmina.

Análise estatística

A associação entre variáveis qualitativas foi avaliada através de testes exatos para tabela de contingência. Aplicou-se, nos demais casos, o teste t, para a comparação de duas médias, e análise de variância, com o objetivo de comparar mais de duas médias. Nas situações em que se detectou diferença entre médias por meio de análise de variância, procedeu-se com a execução do teste de comparação de múltiplas médias de Tukey, a fim de detectar quais, dentre as médias comparadas, de fato diferem. Todas as conclusões baseiam-se em um nível de 5% de significância (VIEIRA, 2004; BUSSAB & MORETTIN, 2006).

Para comparar os estadiamentos com relação ao percentual de cadelas com pseudogestação, castrada, multiparidas, que abortaram, que utilizaram contraceptivo, que apresentaram secreção vaginal e que possuem cio regular foi utilizado o teste exato de Fisher ao nível de significância $\alpha = 0,05$ (SAS, 1999).

Para comparar os estadiamentos com relação ao PCNA da mama e da Caspace-3 da mama foi utilizado o teste F da Análise de variância (ANOVA) para amostras independentes ao nível de significância $\alpha = 0,05$ seguido do teste de Bonferroni para comparações múltiplas. A verificação da normalidade das variáveis PCNA da mama e Caspace-3 da mama na amostras dos diferentes estadiamentos foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homocedasticidade entre os grupos foi testada por meio do teste de Leneve. Em ambos os testes o nível de significância foi $\alpha = 0,05$ (SAS, 1999).

Para comparar os tipos de carcinomas (simples e complexo) com relação ao percentual de cadelas com pseudogestação, castradas, multiparidas, que abortaram, que utilizaram contraceptivo, que apresentaram secreção vaginal e que possuem cio regular foi utilizado o teste de qui-quadrado ou o teste exato de Fisher ao nível de significância $\alpha = 0,05$ quando as pressuposições para o uso do teste de Qui-quadrado não eram atendidas.

Para comparar os grupos de carcinoma simples e complexo com relação ao PCNA da mama e da Caspase-3 da mama foi utilizado o teste t de Student para amostras independentes ao nível de significância $\alpha = 0,05$. A verificação da normalidade das variáveis PCNA da mama e Caspase-3 da mama nos dois grupos foi testada utilizando o teste de Shapiro Wilk ao nível de significância $\alpha = 0,05$ e a verificação da igualdade de variância entre os grupos foi testada por meio do teste de Levena ao nível de significância $\alpha = 0,05$ (SAS, 1999).

Para comparar o tumor primário com metástase pulmonar em relação ao PCNA e Caspase-3 no estadiamento IV foi utilizado o teste t de Student para amostras independentes ao nível de significância $\alpha = 0,05$. A verificação da normalidade das variáveis PCNA e Caspase-3 foi testada utilizando o teste de Shapiro Wilk ao nível de significância $\alpha = 0,05$ e a verificação da igualdade de variância entre os grupos foi testada por meio do teste de Levena ao nível de significância $\alpha = 0,05$ (SAS, 1999).

Para comparar os graus de malignidade I e II em relação ao IP da mama e da IAPOP da mama foi utilizado o teste de Mann-Whitney para amostras independentes ao nível de significância $\alpha = 0,05$. A verificação da normalidade das variáveis PCNA e Caspase foi testada utilizando o teste de Shapiro Wilk ao nível de significância $\alpha = 0,05$ (SAS, 1999).

Para estudar o efeito da ulceração sobre o PCNA da mama e da Caspase-3 da mama foi utilizado o teste de Mann-Whitney para amostras independentes ao nível de significância $\alpha = 0,05$. A verificação da normalidade das variáveis PCNA e Caspase-3 foi testada utilizando o teste de Shapiro Wilk ao nível de significância $\alpha = 0,05$ (SAS, 1999).

Para estudar o efeito da presença de linfonodo positivo (metástase) sobre o PCNA da mama foi utilizado o teste t de Student para amostras independentes ao nível de significância $\alpha = 0,05$ e sobre a Caspase-3 da mama foi utilizado o teste de Mann-Whitney para amostras independentes ao nível de significância $\alpha = 0,05$. A verificação da normalidade das variáveis PCNA e Caspase-3 foi testada utilizando o teste de Shapiro Wilk ao nível de significância $\alpha = 0,05$ (SAS, 1999).

RESULTADOS

No presente trabalho, pelo número de animais avaliados, optou-se pelo agrupamento dos animais nos estágios tumorais I (local), II (A e B), III (A e B) e IV (metastático).

Os resultados individuais dos cães no estágio I da doença estão apresentados nos anexos A, B, C e D; do estágio II nos anexos E, F, G e H; do estágio III nos anexos I, J, K e L e do estágio IV nos anexos M, N, O e P.

O estudo foi realizado com 40 cadelas sem raça definida, de diferentes portes apresentavam câncer de mama. Foram estudados animais de 3 a 15 anos de idade, 37 (92,5%) deles acima de 6 anos, 19 (47,5%) com idade superior a 10 anos e dois animais (5%) com idade de três anos. O porte dos animais variou de quatro de porte pequeno (10%) e porte médio (45%) e grande (45%). A obesidade esteve presente em 22 (55%) cadelas. Em 32 (80%) cadelas a alimentação era mista, caseira e industrial, sendo que oito cadelas (20%) receberam exclusivamente comida caseira e nenhuma, exclusivamente ração (Figura 1).

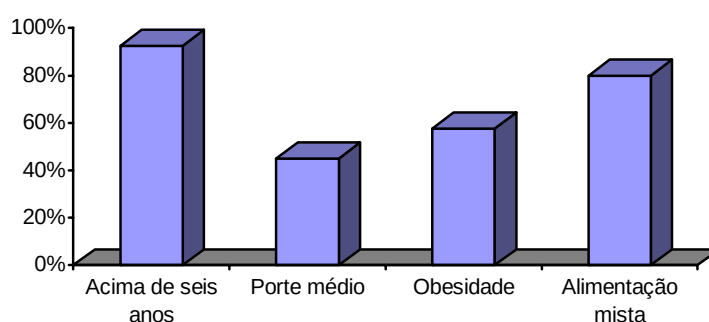


Figura 1- Percentual de animais com as principais características clínicas e epidemiológicas avaliadas (n=40).

Pela história da doença atual 30 cadelas (75%) eram multíparas, quatro animais tiveram pelo menos um abortamento até o momento do diagnóstico, percentual idêntico ao número de cadelas castradas. 37 cadelas (92,5%) apresentaram cios regulares, 16 (40%) já tiveram pseudogestação e oito (20%) foram submetidas à administração de contraceptivos (Figura 2).

As lesões mostraram-se mais freqüentes nas mamas inguinais, acometendo 28 animais (70%) com distribuição semelhante entre as cadeias direita 31 (77%) e esquerda 33 (82,5%). A distribuição foi crescente no sentido antero-posterior em ambas as cadeias. Dentre as 40 cadelas, sete (17,5%) apresentaram um único nódulo mamário enquanto que o envolvimento multicêntrico estava presente em 33 (82,5%) animais. O envolvimento bilateral das mamas acometeu 24 animais (60%) Figura 3.

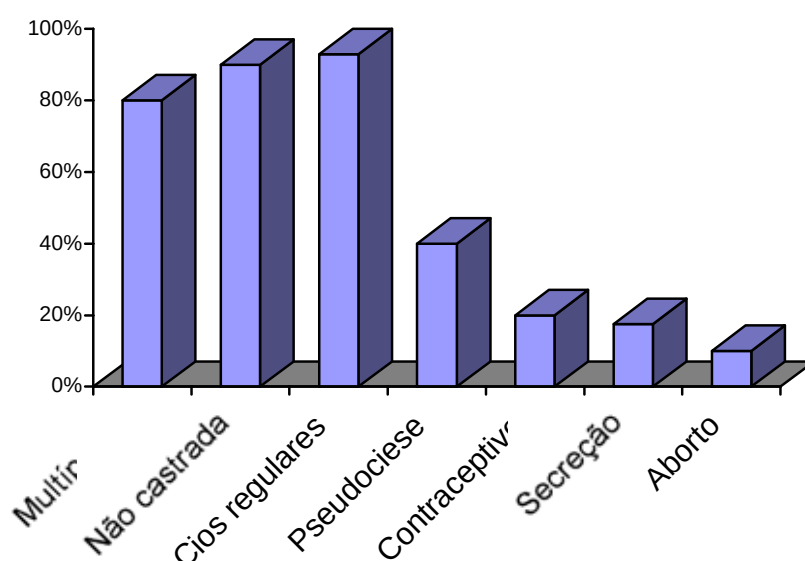


Figura 2- Prevalência dos animais com as características reprodutivas estudadas.



Figura 3- Cadela SRD de porte grande - TNMcII, portadora de câncer de mama multicêntrico bilateral.

Prevaleceu o tamanho tumoral menor que cinco centímetros de diâmetro em 15 animais (37,5%) acometidos. Como característica clínica geral da amostra tumoral, há evidência estatística de associação entre os estágios da doença com o aspecto clínico do tumor (sólido, cístico e infiltrativo) $P=0,00023$ (Tabela 2).

Apesar de não existir evidência estatística de associação entre os estágios da doença e a consistência do tumor (firme, macia e elástica), prevaleceram os tumores de consistência firme (Figura 4).

Dentre as associações de imunomarcacão para os anticorpos primários PCNA e caspase-3 não houve evidência estatística de que IP e IAPOP sejam diferentes dentre os tamanhos tumorais.

Tabela 2- Diferença estatística de associação entre os estágios da doença e aspecto clínico do tumor.

Aspecto clínico	Estágio				Total
	I	II	III	IV	
Sólido	10	6	4	6	26
Cístico	0	4	0	0	4
Infiltrativo	0	0	6	4	10
Total	10	10	10	10	40

P=0,00023

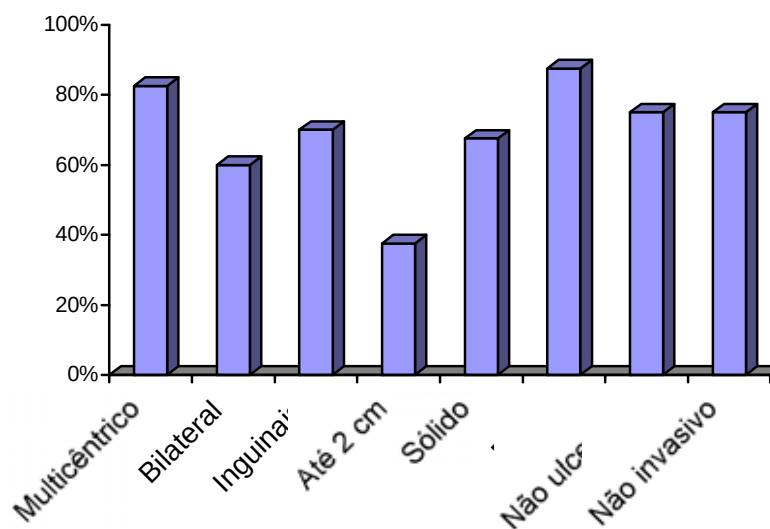


Figura 4- Porcentagem de animais em cada característica clínica estudados dos tumores de mama.

A média de idade de acordo com o estágio da doença entre os animais foi de dez anos para os estágio II e III, nove anos para o estágio I e sete anos para o estágio IV (Tabela 3).

Não houve associação significativa do estadiamento clínico do tumor com as variáveis idade e obesidade. Embora sem associação significativa da idade sobre o estadiamento tumoral, o estágio III foi mais freqüente nos animais mais velhos (média de 10 anos) e a forma mais grave da doença nos animais com idade entre seis a nove anos (média de 7,5 anos). Com a mesma limitação estatística, a maioria dos animais obesos esteve distribuída no estágio II (80%), seguido dos estágios I e III (50%) e com menor freqüência no estágio IV (40%) Figura 5 (Tabela 4).

Tabela 3 - Distribuição da freqüência do estadiamento clínico neoplásico de acordo com a idade dos animais.

Idade	Estágio				Total
	I	II	III	IV	
Até 5	1	0	1	1	3
6 – 9	5	5	1	7	18
> 10	4	5	8	2	19
Total	10	10	10	10	40

*Idade = anos
P=0,22



Figura 5- Cadela SRD – TNM-I (A). Cadela SRD – TNM-II (B). Cadela SRD – TNM-III (C). Cadela SRD –TNM-IV (D). Raio x correspondente ao animal anterior, onde observa-se metástase pulmonar (E).

Tabela 4- Distribuição da frequência do estadiamento clínico com a condição corporal dos animais.

Condição corporal	Estágio				Total
	I	II	III	IV	
Peso ideal	4	1	2	6	13
Acima do peso	1	1	3	-	5
Obeso	5	8	5	4	22
Total	10	10	10	10	40

P=0,15

Embora sem associação estatística, prevaleceram no estadiamento clínico I, II e IV os animais de porte grande com metade dos casos, e no estágio III prevaleceu o porte médio (70%) Tabela 5.

Tabela 5- Distribuição da frequência do estadiamento clínico com o porte dos animais.

Porte	Estágio				Total
	I	II	III	IV	
Pequeno	2	1	-	1	4
Médio	3	4	7	4	18
Grande	5	5	3	5	18
Total	10	10	10	10	40

P=0,15

Nenhuma das características reprodutivas das cadelas tiveram diferença significativa entre os estágios da doença (Tabela 6).

Tabela 6- Distribuição da casuística em cada característica entre os estadiamentos da doença.

Características	Estadiamento				P^(*)
	I (n=10)	II (n=10)	III (n=10)	IV (n=10)	
Pseudo Gestação (%)	60,0	20,0	40,0	40,0	0,391
Castrada (%)	10,0	20,0	10,0	0,0	0,890
Crias (%)	80,0	70,0	60,0	90,0	0,621
Aborto (%)	0,0	20,0	20,0	0,0	0,299
Uso de contraceptivo (%)	0,0	40,0	20,0	20,0	0,206
Secreção vaginal (%)	10,0	20,0	30,0	10,0	0,804
Cio regular (%)	100,0	90,0	100,0	80,0	0,595

(*) Teste exato de Fisher ao nível de significância $\alpha = 0,05$.

Os valores de IP não apresentaram diferença significativa entre os diferentes estágios da doença, no entanto houve evidência estatística de que a média de IAPOP seja diferente entre os quatro estágios. Verifica-se maior quantidade média de células imunomarcadas para caspase-3 no estágio III em relação aos estágios I e II. Estima-se que este incremento seja de aproximadamente 35 núcleos celulares imunomarcados a mais no estágio III que os dois estágios iniciais ($P < 0,001$) Tabela 7 (Figuras 6 e 7).

Tabela 7- Resumo descritivo e valores de PCNA e caspase-3 referentes às comparações entre os estadiamentos da doença.

Biomarcadore s	Estadiamento				p ^(*)
	I (n=10)	II (n=10)	III (n=10)	IV(n=10)	
PCNA	25,60 ±	37,90 ±	32,40 ±	35,90 ±	0,112
	6,85	15,82	11,58	10,62	
CASPASE-3	29,20 ±	28,90 ±	64,70 ±	45,10 ±	<0,001 ⁽¹⁾
	9,37	19,24	18,64	24,44	

(*) ANOVA ao nível de significância $\alpha = 0,05$.

(1) I < III (p = 0,001) ; II < III (p=0,001) – Teste de Bonferroni

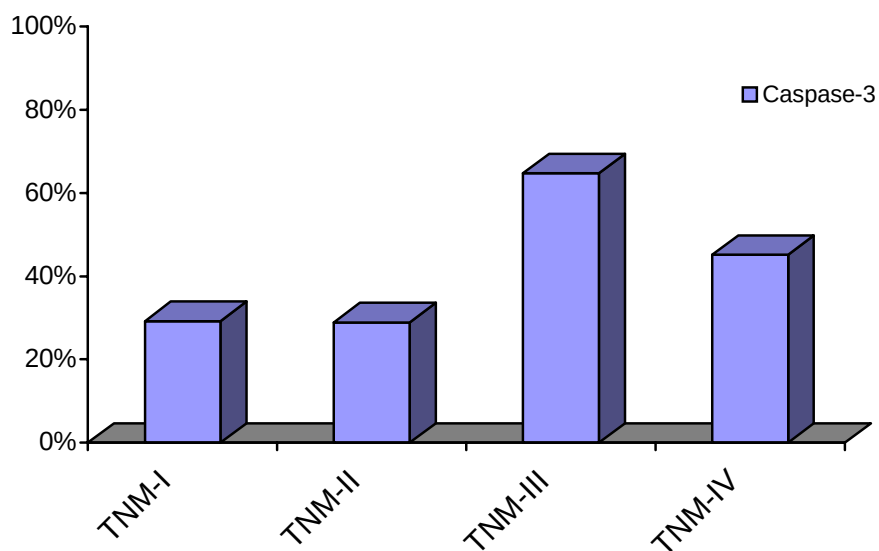


Figura 6- Relação entre o estadiamento clínico (TNM) e o IAPOP avaliado pela caspase-3.

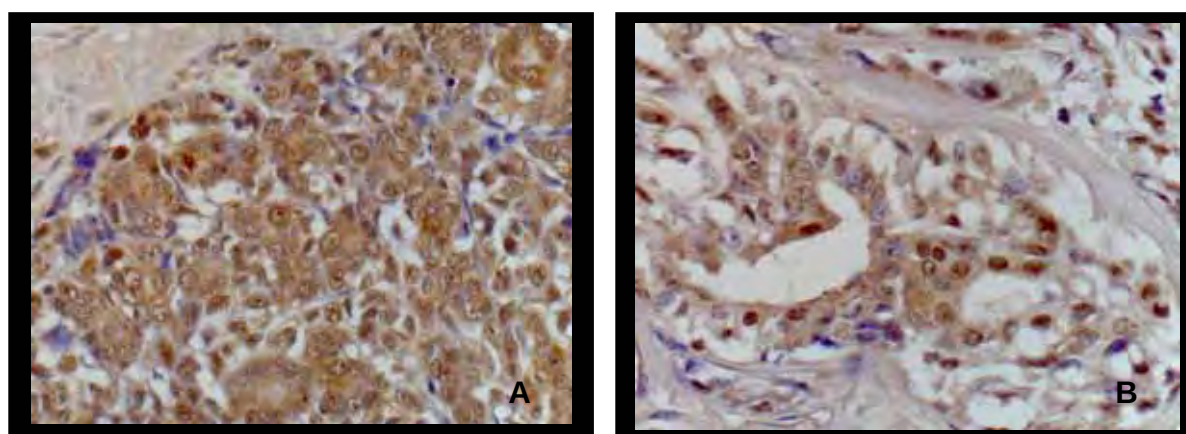


Figura 7- Carcinoma simples - TNM II, histopatológico positivo para caspase-3 40x (A). Carcinoma simples - TNM III, histopatológico positivo para caspase-3 40x (B).

As associações dos biomarcadores PCNA e caspase-3 não apresentaram diferenças significativas entre as cadelas linfonodo-positivas com as linfonodo-negativas (Tabela 8). Por outro lado a caspase-3 mostrou associação significativa entre os tumores ulcerados e aqueles não ulcerados ($P < 0,049$) Tabela 9.

Desta forma, IAPOP teve associação positiva com as cadelas no estágio III da doença e portadoras de tumores ulcerados.

Tabela 8 - Resumo descritivo e valores de PCNA e caspase-3 referentes ao estudo do efeito da presença de linfonodo positivo.

Biomarcadores	Linfonodo Positivo		p
	Não	Sim	

PCNA	33,2 ± 13,1	33,1 ± 9,4	0,809 ⁽¹⁾
CASPASE-3	36,0 (24,0 ; 50,5)	53,0 (28,0 ; 68,0)	0,225 ⁽²⁾

(1) Teste t de Student ao nível de significância $\alpha = 0,05$. Valores expressos em média e desvio-padrão.

(2) Teste de Mann-Whitney ao nível de significância $\alpha = 0,05$. Valores expressos em mediana e quartís.

Tabela 9 - Resumo descritivo e valores de PCNA e caspase-3 referentes ao estudo do efeito da ulceração tumoral.

Biomarcadores	Ulcerado		p^(*)
	Não	Sim	
PCNA	30,0 (24,5 ; 36,5)A	34,0 (26,0 ; 51,0)A	0,187
CASPASE-3	30,0 (24,0 ; 41,5)A	57,0 (38,0 ; 65,0)B	0,049

(*) Teste de Mann-Whitney ao nível de significância $\alpha = 0,05$.

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si pelo Teste de Mann-Whitney ao nível de significância $\alpha = 0,05$.

No estágio terminal (IV) as associações dos biomarcadores de proliferação e apoptose celular não apresentaram diferença significativa entre amostras de tumor primário com suas respectivas metástase pulmonar. No entanto, ao nível de 10% de significância, pode-se afirmar que as médias de IAPOP no pulmão e na mama são diferentes. Estima-se que a quantidade de células em apoptose no pulmão seja em média 27,1 unidades nucleares imunomarcadas a mais que na mama (Tabela 10) Figura 7.

Tabela 10 - Resumo descritivo e valores de PCNA e caspase-3 referentes às comparações entre os tumores primário e metastático no estadiamento IV.

Biomarcadores	Local/Metástase		p^(*)
	Mama	Pulmão	
PCNA	35,90 ± 10,62	36,20 ± 10,92	0,951
CASPASE-3	45,10 ± 24,44	65,90 ± 41,84	0,191

(*) Teste t de Student ao nível de significância $\alpha = 0,05$.

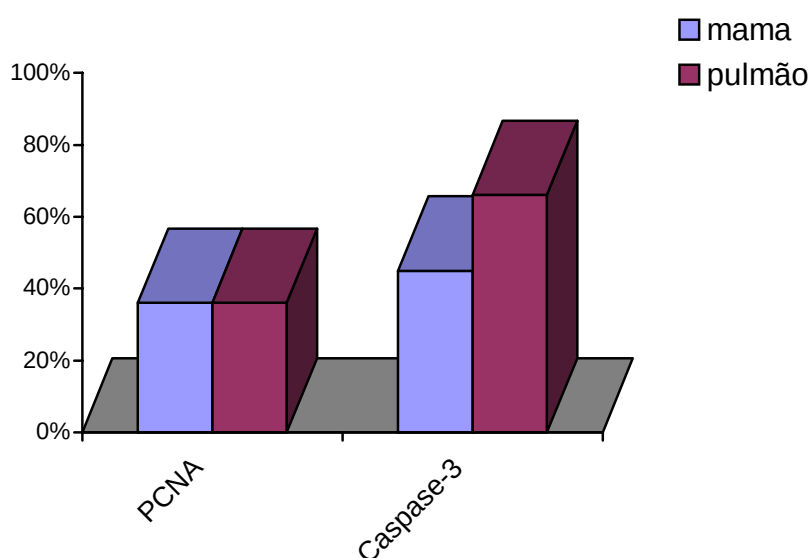


Figura 7- Média de IP e IAPOP entre o tumor primário e respectiva metástase pulmonar.

A frequência de carcinoma simples foi idêntica entre os estágios da doença, comprometendo 7 (70%) animais de cada grupo (Figura 8), restando três animais de cada estágio com carcinoma complexo (Figura 9) Tabela 11.

O estadiamento tumoral mais avançado (IV) foi mais freqüente nos animais com idade média de 8 anos, não obesos, portadoras do carcinoma simples. Apesar dos animais não obesos prevalecerem no estágio IV, nenhum apresentou como condição corporal a magreza ou até mesmo a caquexia, talvez pela interferência do curso biológico natural da doença por parte dos proprietários, optando pela eutanásia.

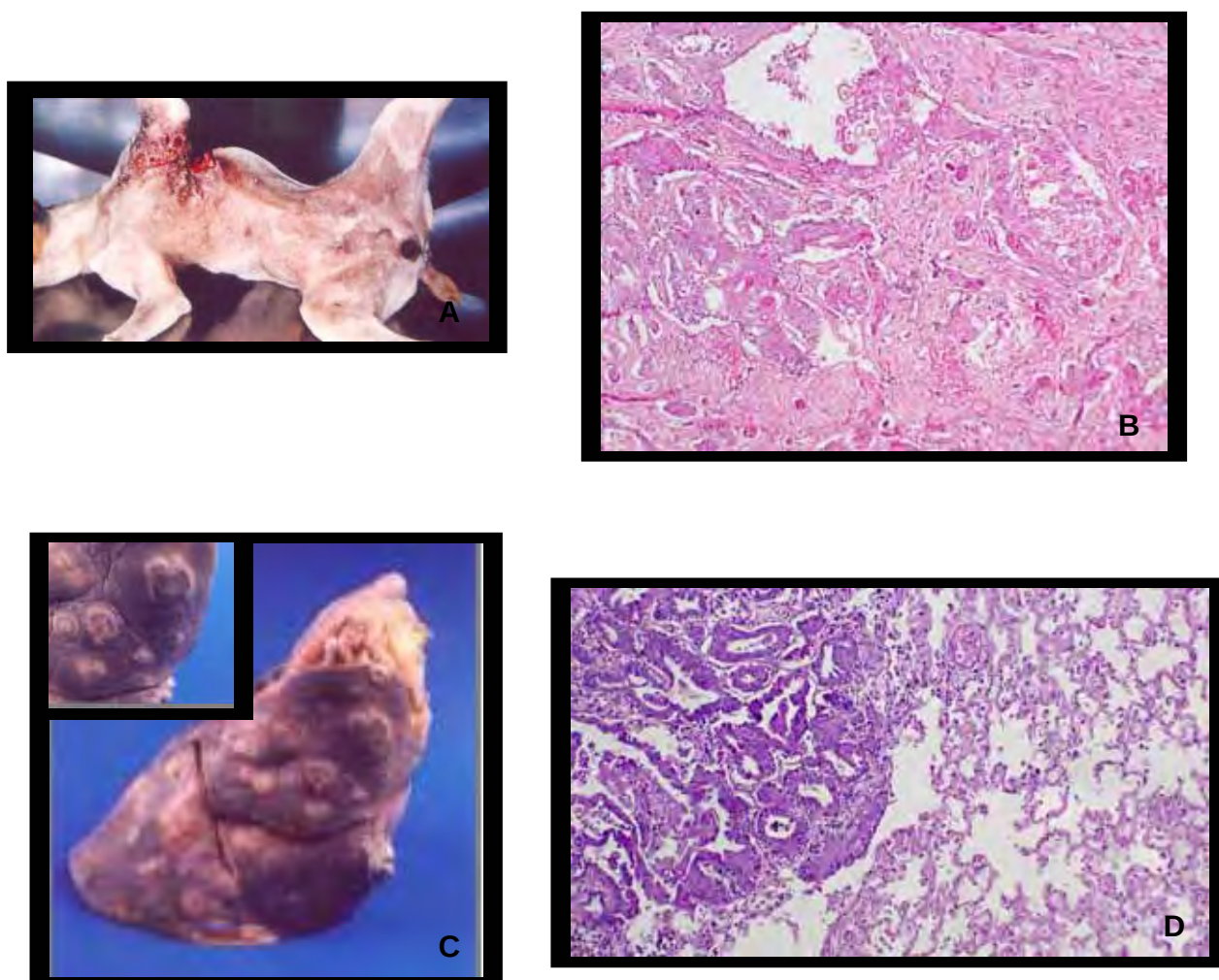


Figura 8- Cadela SRD portadora de carcinoma simples mamário – TNM IV (A). Histopatologia correspondente - H&E 5x (B). Pulmão com metástase, fixado em formalina 10%. Destaque, lobo pulmonar cranial direito (C). Histopatologia correspondente - H&E 5x (D).

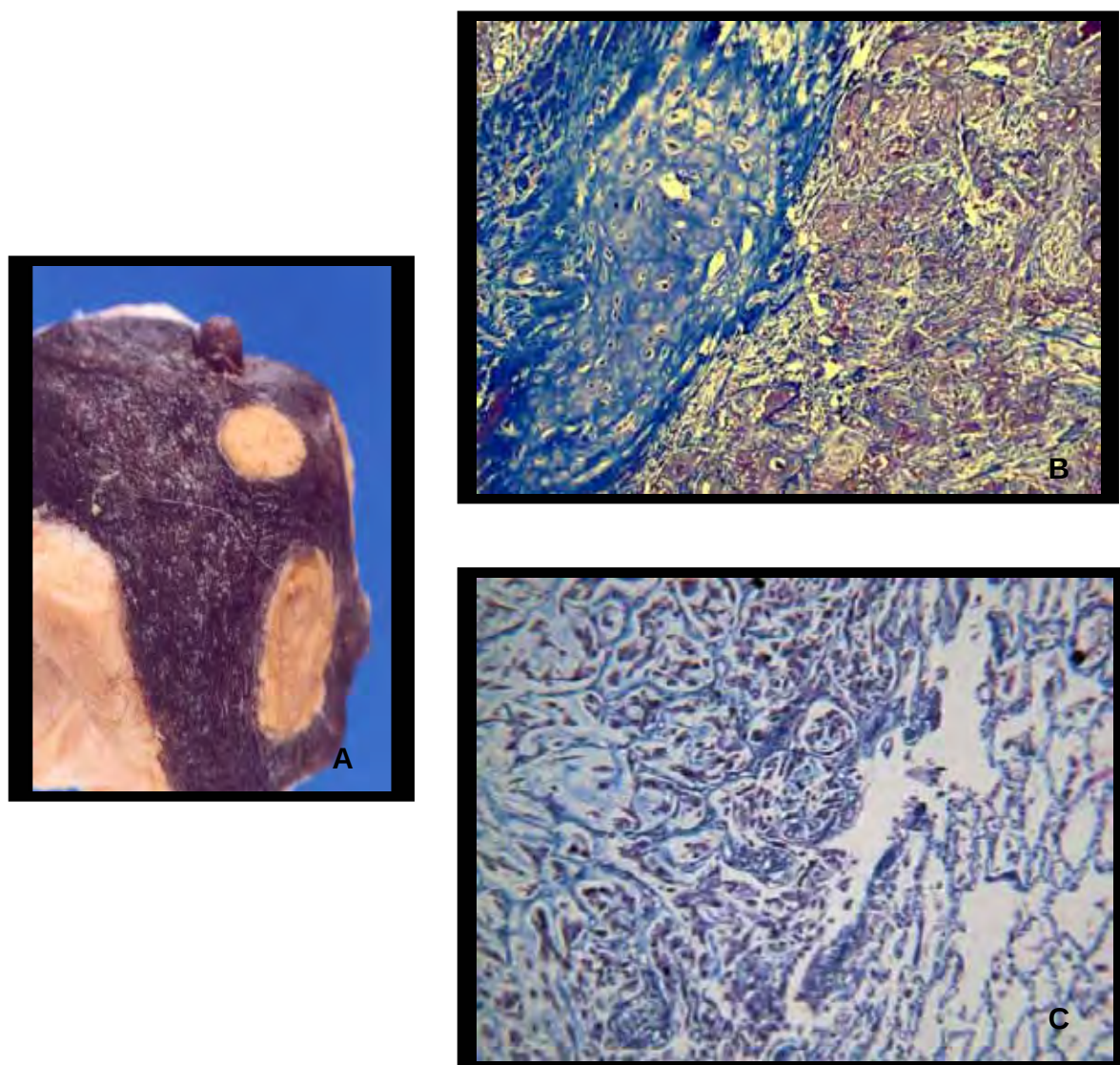


Figura 9- Carcinoma complexo mamário – TNM IV (A). Histopatologia correspondente - Masson 5x, (B). Histopatologia, metástase pulmonar - Masson 20x (C).

Tabela 11- Distribuição da frequência do estadiamento clínico conforme o tipo de tumor.

Tipo de tumor	Estágio				Total
	I	II	III	IV	
Carcinoma simples	7	7	7	7	28
Carcinoma complexo	3	3	3	3	12
Total	10	10	10	10	40

p= 1

Dentre as portadoras de neoplasia mamária, 28 (70%) delas apresentaram exclusivamente o componente epitelial (carcinoma simples) Figura 10, e 12 (30%) cadelas o carcinoma complexo (Figura 11).

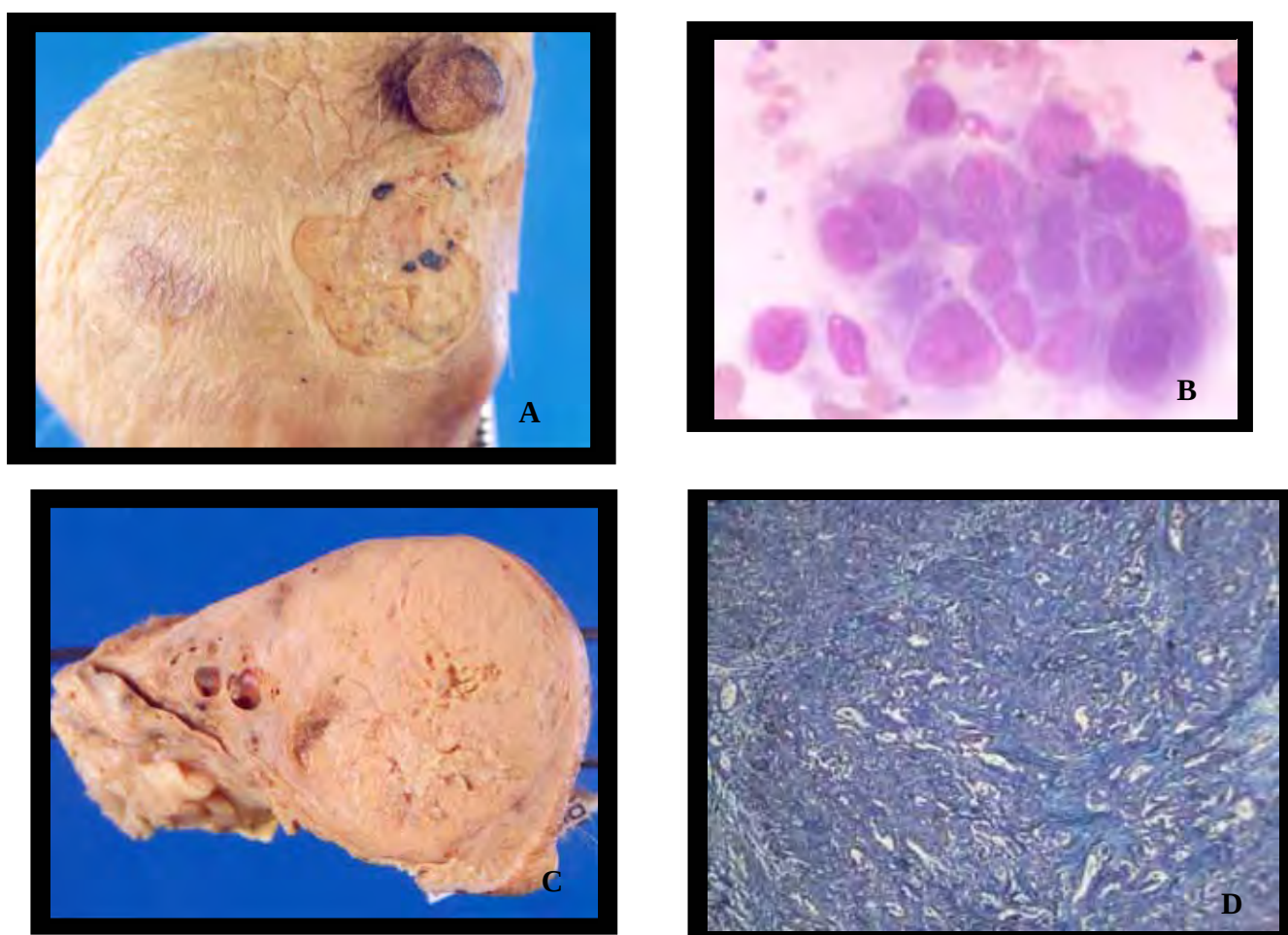


Figura 10 – Carcinoma simples mamário – M5E – TNMc III. Macroscopia (A). Citopatologia – Giemsa 40X (B). Superfície de corte (C). Histopatologia – Masson 5x (D).

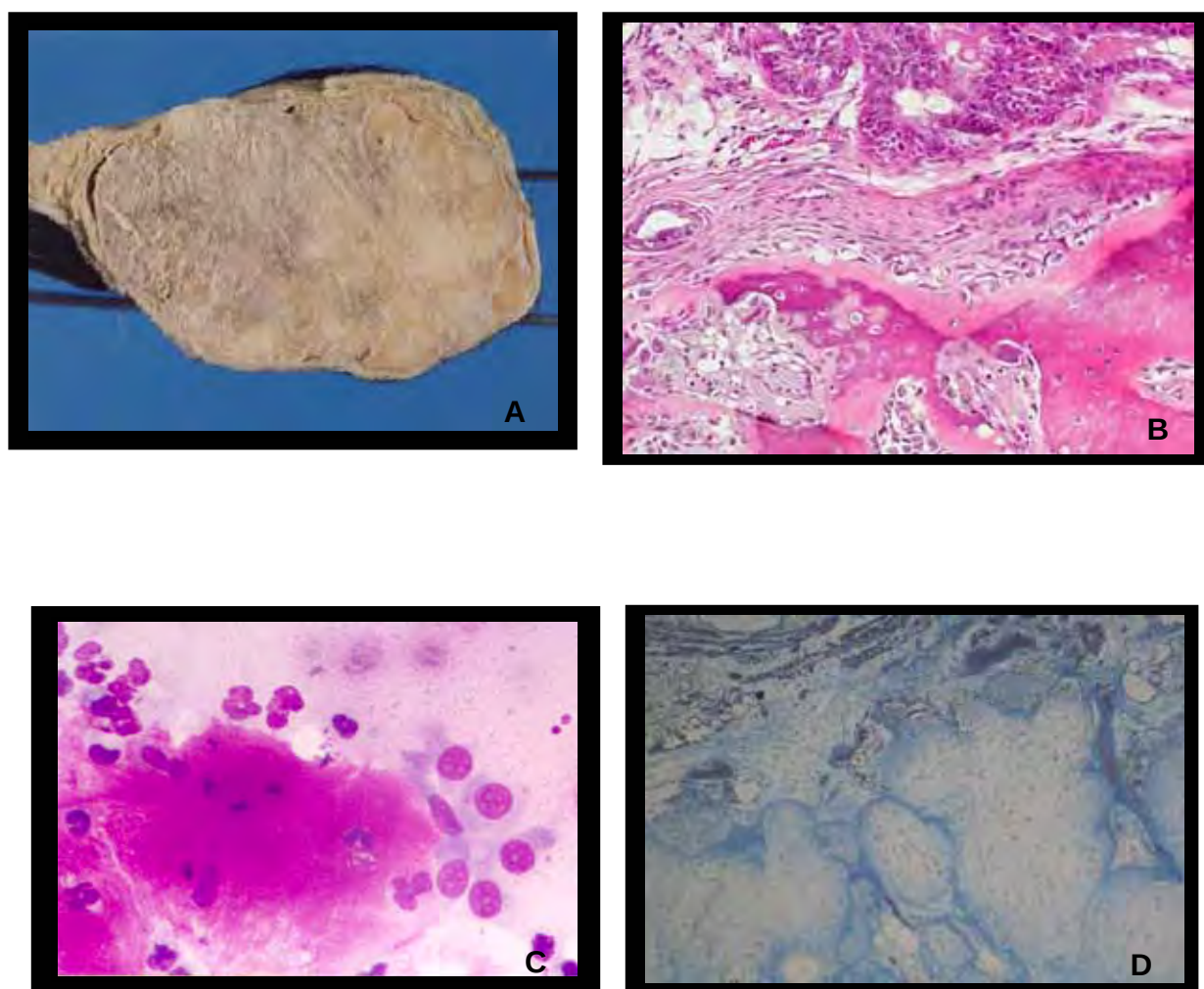


Figura 11- Carcinoma complexo mamário – M5E – TNMc IV. Macroscopia (A). Histopatologia correspondente – H&E 20x (B). Citopatologia – Giemsa 40X (C). Histopatologia - Masson 5x (D).

Não houve diferença estatística entre os tipos de carcinoma com relação a idade das cadelas. A mesma restrição estatística foi observada com relação ao porte, condição corporal e tamanho tumoral.

Com a mesma restrição estatística apresentou-se a obesidade, vista em 16 animais (57%) com carcinoma simples e seis animais (50%) com carcinoma complexo. Essa sequência foi observada também para a multiparidade (75% e 75%),aios regulares (96% e 83%) e castradas (11% e 8%) Tabela 12 e Figura 12.

Assim, nas cadelas portadoras de câncer mamário, prevaleceu o carcinoma simples (70%), associado à obesidade (57%), multiparidade (82%),aios regulares (89%), castradas (11%) e maiores expressões de caspase-3 no estágio III da doença.

Tabela 12 - Distribuição da casuística em cada característica reprodutiva entre os carcinomas.

Características	Carcinoma		p
	Simples (n =28)	Complexo (n =12)	
Pseudogestação (%)	39,3	41,7	0,888 ^(*)
Castrada (%)	10,7	8,3	1,000 ^(**)
Crias (%)	75,0	75,0	1,000 ^(**)
Aborto (%)	10,7	8,3	1,000 ^(**)
Uso de contraceptivo (%)	14,3	33,3	0,211 ^(**)
Secreção vaginal (%)	17,9	16,7	1,000 ^(**)
Cio regular (%)	96,4	83,3	0,209 ^(**)

(*) Teste de Qui-quadrado no nível de significância $\alpha = 0,05$.

(**) Teste de exato de Fisher no nível de significância $\alpha = 0,05$.

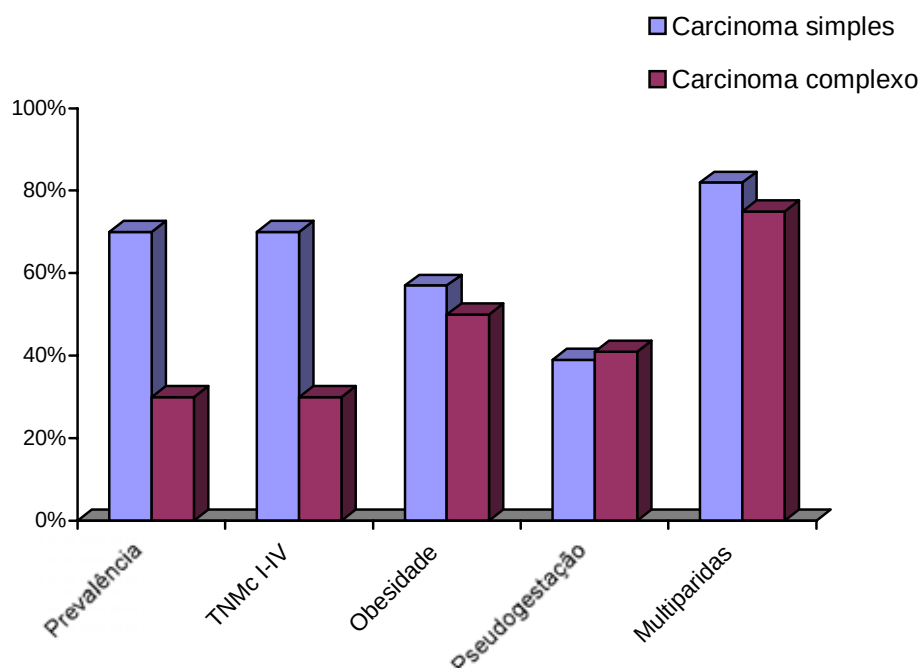


Figura 12- Porcentagem de animais que apresentaram as características clínicas estudadas de acordo com o tipo de tumor

As variáveis IP IAPOP não apresentaram associação significativa entre os tipos de tumores (carcinoma simples x carcinoma complexo), no entanto estes índices foram superiores no carcinoma simples (Tabela 13) Figuras 13 e 14.

Tabela 13 - Resumo descritivo e p-valores referentes às comparações entre os tipos de carcinoma.

Biomarcadores	Carcinoma Simples				Carcinoma Complexo				p ⁽¹⁾
	n	Mínimo	Máximo	Média ± DP	n	Mínimo	Máximo	Média ± DP	
PCNA	28	15,00	64,00	33,14 ± 12,35	12	16,00	54,00	32,50 ± 12,24	0,881
CASPASE	28	9,00	100,00	45,14 ± 25,68	12	12,00	65,00	34,58 ± 15,04	0,114

(1) Teste t de Student ao nível de significância $\alpha = 0,05$.

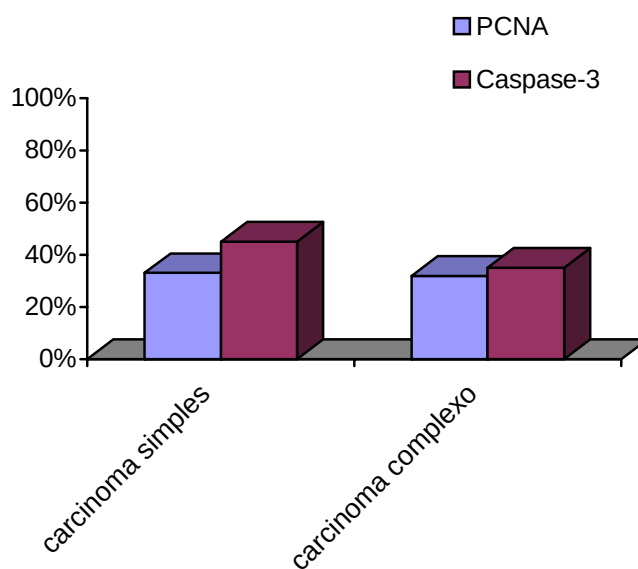


Figura 13- Porcentagem de positividade para IP e IAPOP de acordo com o tipo tumoral.

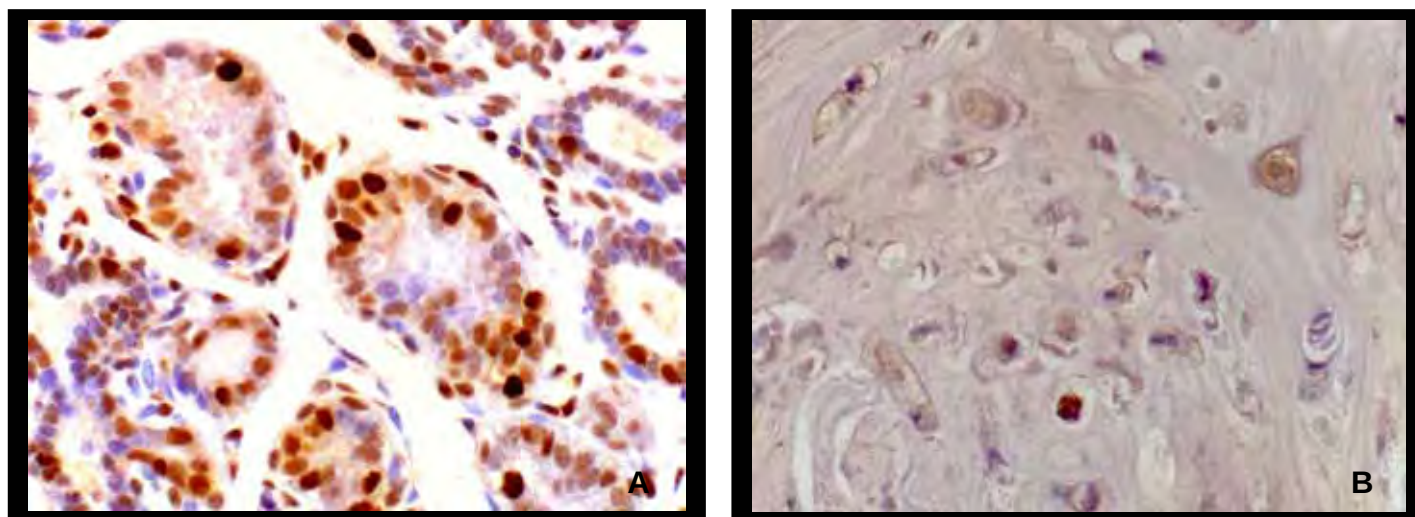


Figura 14 - Carcinoma simples – TNM I, positivo para PCNA 40x (A). Carcinoma complexo, área condromatosa - TNM I, positivo para caspase-3 40x (B).

Verificou-se que dentre os tumores complexos 75% apresentaram grau de malignidade I, ou seja, o melhor prognóstico possível para um tumor maligno (Tabela 14). Chama a atenção que nenhum entre os tumores complexos se enquadraram no grau III, ou seja a pior versão tumoral. Já para o carcinoma simples, verificou-se que ocorreram 68% de grau I, 29% de grau II e (4%) com grau III. Grande parte dos tumores simples, foram do tipo túbulo-papilar, que se trata do menos maligno dos carcinomas simples. justificando o maior número de tumores grau I (Figura 15).

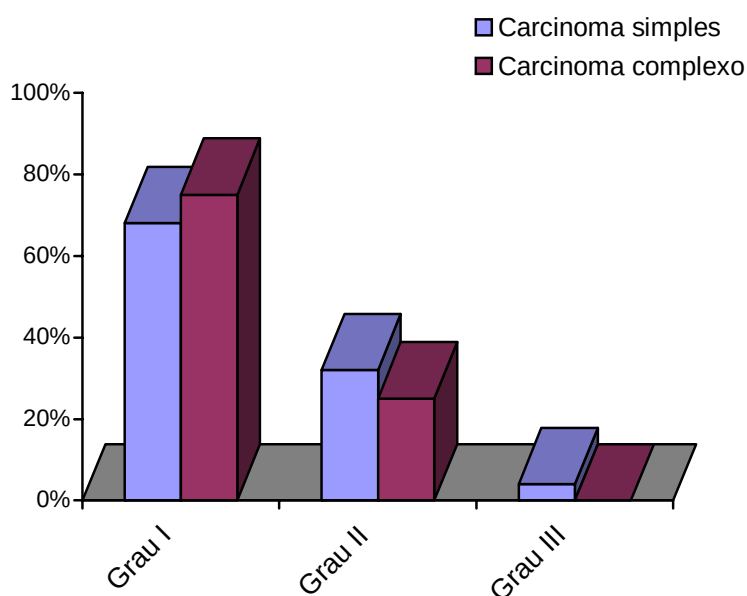


Figura 15- Distribuição dos tumores (carcinoma simples e carcinoma complexo) pela graduação histopatológica.

Tabela 14 – Distribuição histológica descritiva de carcinomas mamários com respectivos graus de malignidade, recebidos para diagnóstico.

Tipos	Grau de malignidade			Total
	I	II	III	
Carcinoma simples	18	9	1	28
Carcinoma complexo	9	3	-	12
Total	27	12	1	40

Com a limitação de apenas um animal ser classificado no grau III, a versão menos diferenciada entre os carcinomas, foi realizado análise com os dois primeiros graus de malignidade, os quais não apresentaram diferença estatística entre as variáveis IP e IAPOP de acordo com o grau histológico (Tabela 15).

Tabela 15 - Resumo descritivo e valores de PCNA e caspase-3 referentes às comparações entre os graus de malignidade.

Biomarcadores	Grau de malignidade		p^(*)
	1	2	
PCNA	26,0 (20,0 ; 36,0)	34,0 (30,0 ; 47,5)	0,061
CASPASE-3	30,0 (24,0 ; 61,0)	37,5 (32,0 ; 61,5)	0,456

(*) Teste de Mann-Whitney ao nível de significância $\alpha = 0,05$. Valores expressos em mediana e quartís.

DISCUSSÃO

Conforme o já estabelecido pela literatura, o tumor de mama canino é biologicamente similar à neoplasia mamária na mulher, sendo considerada como modelo experimental para carcinogênese mamária (O'BRIEN, 2000; CASSALI *et al.*, 2005).

A anamnese, os exames físicos e complementares foram fundamentais na definição do diagnóstico, estadiamento do tumor, classificação da neoplasia e instituição da terapia, conforme MORRISON (1998) afirmou.

Para Yamagamy *et al.* (1996), nos cães, o estadiamento clínico parece ser tão significativo quanto a classificação histológica. No presente trabalho o estadiamento clínico foi de fundamental importância para que se estabelecesse a classificação clínica precisa e de comum acordo com as citadas pela literatura.

O material proveniente de mastectomia e necropsia, junto ao processamento rotineiro de cortes histológicos processados e conservados em parafina, corados em H&E proporcionaram aos clínicos/cirurgiões diagnóstico definitivo. Com o exame clínico minucioso e auxílio do raio X, foi possível detectar a presença de metástases à distância, em especial as ganglionares e pulmonares (estágio IV).

Muitos dos trabalhos realizados nesta área (BOSTOCK, 1986; HELLMÉN *et al.*, 1993; YAMAGAMI *et al.*, 1996; PÉREZ ALENZA *et al.*, 1997) basearam-se na classificação proposta pela O.M.S em 1974 (HAMPE & MISDORP, 1974). Moulton (1990) simplifica esta classificação ao considerar como tumores complexos todos os tumores com proliferação conjunta de células epiteliais e mioepiteliais, com ou sem diferenciação cartilaginosa e/ou óssea, o que nos pareceu adaptar-se melhor à presente série de tumores. Dos tumores complexos deste estudo, 17% apresentaram diferenciação óssea, 25% diferenciação osteóide e 8% diferenciação condróide. Este último apresentou aspecto clínico mais agressivo como ulceração cutânea, envolvimento de linfonodos e metástase a distância, enquanto nos tumores com diferenciação osteóide 33% apresentou ulceração e

envolvimento de linfonodos. Com estes achados, fica evidente seu comportamento agressivo e potencial metastático, apesar da menor incidência.

Em humanos, inúmeros estudos epidemiológicos têm investigado o papel das medidas antropométricas, incluindo peso ou índice de massa corporal, ganho de peso, localização topográfica do tecido adiposo, relacionado com o risco de câncer de mama (TRENTAM *et al.*, 1997; BALLARD, 1999; McTIERNAN, 2000; GREENWALD *et al.*, 2001). Uma vez presente, o câncer evolui inicialmente em compasso nutricional com o hospedeiro, mas em estágios avançados acaba desnutrindo-o resultando em emagrecimento e perda de peso (WOLFSHEIMER, 2000). No presente trabalho utilizou-se a classificação da condição corporal como indicador do estado nutricional e notou-se que nos casos mais avançados da doença os animais apresentavam menor índice de obesidade.

Já está bem estabelecido que a glândula mamária é o sítio mais comum de neoplasia nas cadelas (KOHLI *et al.*, 1998), e que sua incidência aumenta conforme a idade, mais rapidamente aos 6-7 anos de idade; 82% dos tumores de mama ocorrem entre oito e 13 anos de idade nos caninos (SCHNEIDER *et al.*, 1969; ELSE & HANNANT, 1979; MOULTON, 1990; YAMAGAMI *et al.*, 1996; MacEWEN & WITHROW, 1996; STONE, 1998). De forma semelhante aos trabalhos acima citados, 92% das cadelas apresentaram idade superior a seis anos (média 9,7 anos) até o momento do exame, o que corresponde a cerca de 50 anos na mulher pela tabela de Lebeau (CASSALI, 2000). Certamente o fator idade pode predispor às afecções oncológicas conforme afirmam inúmeros autores, pois no decorrer deste estudo não diagnosticou-se nenhuma neoplasia em animais com poucos meses de idade, sendo, portanto, estes casos extremamente raros.

Estudos realizados no Brasil indicam que os tumores de mama ocorrem com mais frequência em animais Sem Raça Definida, isso se deve ao fato de haver o predomínio de cães mestiços em nosso país (ZUCCARI, 1999; FERREIRA *et al.*, 2003).

A prevalência de câncer em cães está aumentando consideravelmente. A crescente incidência das afecções neoplásicas nessa espécie tem várias razões, entre elas está a maior longevidade observada nestes animais. Os fatores como a

nutrição com dietas balanceadas, as vacinações prevenindo mais precocemente as doenças infectocontagiosas, os precisos métodos de diagnóstico e também os protocolos terapêuticos cada vez mais específicos e eficazes, contribuem para a maior longevidade dos cães (WITHROW & MacEWEN, 1996; MORRISON, 1998).

A obesidade esteve presente em 55% dos animais, dentre os quais prevaleceu também a alimentação mista, com comida caseira e industrial (80%). Sabe-se que a obesidade é mais comum no sexo feminino, e que as fêmeas castradas apresentam risco duas vezes maior de desenvolvê-la. Em decorrência da menor concentração de hormônios androgênicos, as fêmeas têm menor taxa metabólica basal que os machos; uma vez castradas, a ausência de todos os hormônios sexuais favorece o balanço energético positivo. Além disso, a presença de estrógenos suprime o apetite em várias espécies e raças de animais, como foi demonstrado em cadelas Beagle (JERICÓ & SCHEFFER, 2002).

Estudos também apontam maior predisposição à obesidade em alguns subgrupos, como aqueles constituídos por animais adultos e pertencentes a raças como Labrador, Cairn terrier, Cocker spaniel, Dachshund, Pastores de Sheetland e Beagles (BORGES & NUNES, 1998). Curiosamente, também são considerados mais predispostos à obesidade aqueles animais cujos proprietários são obesos e/ou idosos, e freqüentemente lhes oferecem petiscos ou guloseimas (JERICÓ & SCHEFFER, 2002).

O perfil etário dos animais do presente trabalho evidenciou cadelas SRD obesas entre 3 e 15 anos de idade. Jericó e Scheffer (2002) relatam que a partir da idade de dois anos a obesidade torna-se mais freqüente atingindo sua prevalência máxima na faixa etária compreendida entre 5 e 8 anos de idade, declinando suavemente até os 12 anos; a partir daí, decresce abruptamente.

Em cães foi demonstrado que animais magros possuem menor incidência de câncer que os obesos, desse modo fatores nutricionais podem estar envolvidos no desenvolvimento do tumor de mama (MacEWEN & WITHROW, 1996).

Cadelas obesas, no primeiro ano de vida, apresentam risco maior de desenvolvimento de tumores no decorrer da vida (SORENMO, 1998).

Fatores como obesidade, o qual pode influenciar no processo de iniciação da carcinogênese mamária, também poderia influenciar no prognóstico, mesmo porque, as mulheres na categoria das não obesas, na maioria dos estudos, apresentaram maior tempo de sobrevida (BIRKIMER, 1988; SENIE *et al.*, 1992; WOLFSHEIMER, 2000).

De acordo com Mathé (2000), obesidade afeta a expressão dos receptores de progesterona e pode agravar o “curso” do câncer de mama. O risco relativo de câncer mamário está diretamente associado com o aumento do consumo de gordura. Estudos com animais têm mostrado que o aumento da ingestão de gordura, durante o estágio de iniciação e promoção tumoral, pode aumentar o desenvolvimento de neoplasias mamárias (VORHERR, 1987; RAY *et al.*, 2001; YOO *et al.*, 2001).

Dietas inadequadas têm como consequência além do depósito de gordura no tecido subcutâneo, o aumento na conversão dos andrógenos em estrógenos. As dietas hipercalóricas e/ou hipergordurosas promoveriam o crescimento de bactérias capazes de converter colesterol em estrógenos no intestino grosso (PINOTTI & TEIXEIRA, 2000). Uma dieta rica em gorduras, pobre em fibras e em vitaminas pode ser considerada como fator de aumento do risco do câncer de mama (BIRKIMER, 1988). O que pode ter ocorrido no grupo dos animais estudados, em que 80 % dos animais eram alimentados com dietas caseiras e talvez desbalanceadas.

Quanto aos hábitos alimentares, alguns autores identificaram diferenças entre a dieta de animais obesos e a dieta de animais não obesos. Os resultados do presente trabalho apontam predomínio (55%) de obesidade em cães que ingeriam ração industrial associada à comida caseira. A adição de outros alimentos a uma dieta previamente balanceada, como é a ração comercial (industrial), pode aumentar a densidade calórica do alimento. Por vezes, a administração de petiscos ou de substitutos alimentares como forma de interação social e efetiva entre o proprietário e o cão pode levar ao consumo excessivo de nutrientes, de forma a exceder as necessidades energéticas do animal (JERICÓ & SCHEFFER, 2002; STREIFF *et al.*, 2002).

Nos estágios terminais da doença neoplásica, os animais desenvolvem anorexia, perda de peso e se tornam letárgicos. No entanto, nem toda perda de peso nos pacientes com câncer se deve à anorexia, sendo parte da perda associada a fatores humorais, sendo o principal deles o fator de necrose tumoral (TNF) secretado pelas células tumorais ou pelos macrófagos (indiretamente afetados pela neoplasia) (TRACEY & CERAMY, 1993; WOLFSHEIMER, 2000).

Neste estudo, 75% dos animais eram múltíparas, com pseudogestação em 40% do total de casos.

Para a espécie canina há controvérsias se o número de filhotes teria efeito protetor ou não na incidência de neoplasias mamárias (MOULTON *et al.*, 1970). Vários autores observaram que cadelas nulíparas, ou com ninhadas pequenas têm maior chance de desenvolverem neoplasias da glândula mamária. Alguns autores acreditam que tumores mamários são mais comuns em cadelas nulíparas (STRANDBERG & GOODMAN, 1974). Kohli *et al.* (1998) também relatam a alta incidência de neoplasia mamária em cadelas nulíparas e em animais que tiveram menor número de crias se comparados com cadelas que tiveram muitas crias. No entanto para Morrison (1998) número de filhotes, pseudogestação, ciclo estral anormal não são fatores significantes para tumorigênese mamária.

A relação entre neoplasia mamária e pseudogestação também gera controvérsias. A pseudogestação é um fenômeno normal do ciclo estral canino, mas em algumas cadelas pode estimular ao aparecimento de sintomas clínicos como secreção excessiva de leite e alterações comportamentais. Durante o metaestro normal, progestágenos causam crescimento alveolar e secreção láctea, junto com a proliferação das células mioepiteliais. No entanto, cadelas com manifestações extremas de pseudogestação deverão também apresentar respostas exacerbadas à progesterona, ou menos provável, altos níveis de progesterona sérica. Vallance e Capel-Edwards (1971) foram capazes de induzir o crescimento de nódulos mamários administrando altas doses de progesterona. Assim como vários pesquisadores encontraram associação entre pseudogestação e de neoplasia mamária, outros tantos não encontraram efeito significativo da pseudogestação na incidência destas. Considera-se também, que o leite retido

cronicamente pode conter compostos químicos que têm efeito carcinogênico sobre o epitélio adjacente. Esses agentes podem atuar como indutores e/ou promotores de neoplasia mamária (ZUCCARI *et al.*, 2001). Portanto, neste aspecto, necessitam-se de mais estudos para se estabelecer com precisão o envolvimento da pseudogestação na carcinogênese mamária (ELSE & HANNANT, 1979; MOL *et al.*, 1996).

Neste estudo, as lesões foram mais freqüentes nas mamas inguinais (70%).

A maior incidência de lesões (benignas ou malignas) ocorre nos últimos pares sendo 60% destas nas mamas inguinais, como observado. Essa distribuição anatômica pode ser atribuída ao maior volume dessas mamas, visto que há uma relação entre o tamanho glandular e a incidência de tumor (MOULTON, 1990; ZUCCARI *et al.*, 2001).

Prevaleceu a multicentricidade (83%) neoplásica com distribuição bilateral (60%), sendo que 38% deles foram menores que 2 cm de diâmetro, e 75% apresentaram aspecto não ulcerado à avaliação macroscópica.

De forma semelhante aos demais mamíferos, a mama da cadela é um órgão par e, como o câncer deste órgão é frequentemente um processo multifocal, não é incomum nestas espécies o desenvolvimento independente de câncer entre as mamas (DONEGAN, 1988). O múltiplo envolvimento das mamas com tumores ocorre em 50% dos casos e sua presença não parece alterar o prognóstico nos cães (MOULTON, 1990; STONE, 1998).

Câncer de mama bilateral pode ser resultado tanto de metástases ou do desenvolvimento de um segundo carcinoma primário. Nenhum dos critérios disponíveis é válido para fazer esta distinção. No entanto, de acordo com estes critérios, duas ou mais neoplasias malignas podem coexistir de forma primária independente apenas quando: (1) cada uma apresentar característica histológica própria, (2) os tumores forem separados e localizados em órgãos diferentes, e (3) cada um produzir suas próprias metástases. Muitos outros critérios foram usados por outros autores, mas nenhum é completamente/totalmente aplicável para o problema do câncer mamário bilateral. A decisão deve ser feita na preponderância das evidências (LEIS & URBAN, 1978).

Em nosso estudo, se a neoplasia foi encontrada no interior do parênquima de uma segunda mama no momento do, ou a qualquer momento subsequente ao exame clínico, e avaliações laboratoriais não revelarem evidências de disseminação, a segunda lesão foi considerada como um câncer primário independente. Devido à variabilidade do crescimento neoplásico e o potencial da existência pré-clínica prolongada, algumas vezes não é possível ter certeza quando e por quanto tempo dois tipos de neoplasia coexistem (DONEGAN & SPRATT, 1988).

Sem dúvida, o sinal clínico mais comum do câncer mamário é uma massa presente na mama (DONEGAN, 1988; MISDORP *et al.*, 1999). Neste estudo todas as neoplasias diagnosticadas foram de lesões palpáveis, o que certamente facilitou a realização do exame clínico.

O tamanho do tumor tem mostrado associação estatisticamente significativa com a sobrevida total dos animais. Muitos autores obtiveram os mesmos resultados quer em tumores mamários canino (MISDORP & HART, 1976; PARODI, 1983; YAMAGAMI *et al.*, 1996; PÉREZ ALENZA *et al.*, 1997) como em tumores mamários humanos (CHU *et al.*, 1998; JACQUEMIER *et al.*, 1998; KATO *et al.*, 1999).

Apesar de Moulton (1990) e Kohli *et al.* (1998) afirmarem que a grande maioria dos tumores complexos mamários atingem dimensões menores que cinco centímetros, sendo muitos, menores de 1 cm de diâmetro, Shull e Maddux (1999) afirmam que estes tumores complexos podem evoluir para grandes dimensões e vêm à ulcerar, mas apresentam baixa expectativa de invasão ou metástase, o mesmo afirma Mesa (1988) que estes tendem a ser grandes (4,7 cm). Kohli *et al.* (1998) relatam que o potencial de malignidade do tumor complexo é provavelmente baixo.

Corroborando com estes achados, verificamos que dentre os tumores complexos 75% apresentaram grau de malignidade I, ou seja, tumores bem diferenciados. Chama a atenção que nenhum, entre os tumores complexos, se enquadraram no grau III, ou seja anaplásicos. Já para o carcinoma simples, notamos que ocorreram 68% de grau I, 29% de grau II e 4% de grau III. Grande

parte dos tumores simples, foram do tipo túbulo-papilar, que se trata do menos maligno dos carcinomas simples. justificando o maior número de tumores grau I.

Vários estudos indicam uma relação clara entre o tamanho do tumor e a sobrevida do paciente, mesmo sem o comprometimento de linfonodos regionais. A incidência de recidiva também está relacionada ao tamanho tumoral. Pacientes com tumores maiores apresentam prognóstico significativamente desfavorável, estando também associados a uma maior incidência de comprometimento nodal. Neste estudo os animais que apresentaram envolvimento de linfonodo (n=11) continham tumores maiores que três centímetros (82%), sendo a maioria nos tumores com mais de seis centímetros de diâmetro (55%).

O tamanho tumoral, junto a outros fatores, particularmente o status dos linfonodos regionais, pode definir um amplo espectro prognóstico para a orientação sobre o uso de terapia adjuvante (COUTO & NELSON, 1994; STYLO & WOOD, 1996; YAMAGAMI *et al.*, 1996; FRANCO, 1997; MORRISON, 1998).

Dentre os marcadores moleculares de proliferação celular (PCNA), os estudos não apresentaram correlação significativa com o tamanho tumoral (TAHAN *et al.*, 1993; HORIKUCHI *et al.*, 1998), o mesmo foi observado no presente trabalho. No entanto, em alguns trabalhos citados na literatura mostram que maiores índices apoptóticos foram significativamente correlacionadas com o tamanho do tumor (VILLAR *et al.*, 2001). Não foi encontrado diferença significativa entre o tamanho tumoral e o índice apoptótico no presente trabalho.

Apenas três casos (8%) foram diagnosticados como carcinoma inflamatório, sendo um deles do tipo complexo. Vale a pena ressaltar que esta é uma afecção extremamente agressiva de caráter clínico-patológico com manifestações cutâneas de hiperemia e edemaciação difusa entre as mamas e que geralmente não apresentam massa dominante (DODD & LAYFIELD, 1996; SILVERMAN, 1996). Os sinais clínico-patológicos característico podem iniciar o processo (carcinoma inflamatório primário) ou pode aparecer depois, no decorrer do seu curso (carcinoma inflamatório secundário), sendo este último menos frequente. Os dois tipos carregam o prognóstico grave (DONEGAN, 1988).

Natural que haja diferença estatística entre a presença de ulceração ($P < 0,0001$) tumoral e envolvimento de linfonodos ($P < 0,0001$) entre os estágios da doença, uma vez que são critérios classificatórios para o estadiamento clínico III e IV.

A ulceração cutânea ocorre com relativa frequência nos tumores mamários caninos (PEREZ-ALENZA, 1994). Nos nossos dados e de acordo com Zárate (1996), constatamos que a ulceração cutânea não foi exclusiva do grupo dos carcinoma simples, estando associada significativamente com a malignidade.

Ulcerações têm efeito negativo significativo no tempo de sobrevida das cadelas com diagnóstico de tumores malignos (HELLMEN *et al.*, 1993). No presente estudo, 73% dos tumores apresentaram aspecto não ulcerado. No entanto, quando considerado as lesões ulceradas, estas prevaleceram no estágio III (80%) e nos carcinomas do tipo complexo (42%). O índice apoptótico, avaliado pela imunomarcção para caspase-3 mostrou-se mais sensível em diferenciar lesões com aspecto ulcerado, reforçando sua correlação com as variáveis clínico-patológicas.

SCHONDORF *et al.* (2004) relatam que elevados índices de apoptose indicam melhor prognóstico. Em contrapartida, inúmeros são os trabalhos que correlacionam os elevados níveis de apoptose com fatores prognóstico desfavoráveis (LIU *et al.*, 2001; VILLAR *et al.*, 2001; FERREIRA *et al.*, 2003). Neste trabalho foi possível observar diferença significativa entre os estágios clínico com o índice apoptótico, apresentando maiores expressões nos estágios mais avançados da doença. Então, as associações da caspase-3 com as variações de estadiamento clínico da paciente e aspecto clínico tumoral (ulceração) apresentaram diferença significativa, de comum acordo com os trabalhos que correlacionam a apoptose com fatores desfavoráveis (VILLAR *et al.*, 2001).

Neste trabalho, prevaleceu o carcinoma simples mamário (70%), sub-classificados em cistoadenocarcinoma túbulo-papilífero (36%), carcinoma ductal invasivo (21%), carcinoma sólido (18%), carcinoma tubulo-papilífero (14%) e 4% para cada um dos tipos: tubular, anaplásico e adenoescamoso.

Apesar da maior frequência dos carcinomas, 30% foi do tipo complexo. Entretanto, na literatura pode-se encontrar uma disparidade de dados no que se refere à prevalência dos tumores complexos. Talvez isto possa ser explicado, em parte, pela dificuldade encontrada por alguns patologistas em proceder ao diagnóstico diferencial entre as neoplasias da mama da cadela, possivelmente devido a falta de uniformidade nos critérios de distinção entre os dois tipos de lesões, sobretudo no caso de tumores do tipo complexo (PELETEIRO, 1994; MOULTON, 1990; CASSALI, 2000).

Os tumores complexos são uma entidade tumoral mista bastante controversa, tanto em patologia veterinária (NERURKAR *et al.*, 1989; PELETEIRO, 1994), quanto em patologia humana (SCHMITT, 1994; GOBBI *et al.*, 1993).

Tumor complexo com elementos heterólogos (tecido cartilaginoso ou ósseo) tem sido descrito por apresentar um curso mais agressivo por alguns autores (CATROPPO & LARA, 2001), mas não por todos (STRANDBERG & GOODMAN, 1974; BAKER & LUMSDEN, 1999). Para Monlux *et al.* (1977) o aparecimento de cartilagem, tecido osteóide e osso constituem o último estágio relacionado a estas alterações teciduais, e ainda, enfatiza que a terminologia de cartilagem e osso heterotópico são melhores empregadas nestas condições, por serem alterações proliferativas e não neoplásicas. De forma semelhante, embora apresentem evidências histo/morfológicas de malignidade têm comportamento benigno (CASSALI, 2000). No entanto, estas evidências morfológicas malignas nas células que compõem tais lesões muitas vezes são capazes de metastatizar. Quando os tumores complexos apresentam metástases, estas podem ser representadas por células epiteliais ou também por células pseudo-sarcomatosas, podendo, em um lugar, aparecer metástase com células epiteliais e, em outro, metástase com células pseudo-sarcomatosas (NERURKAR *et al.*, 1989; ZEZZA NETO, 1997). Por outro lado, também foi constatado que os animais com tumores do tipo complexo apresentavam taxas de sobrevida superiores às dos animais portadores de tumores com proliferação exclusiva de células epiteliais (HELLMÉN *et al.*, 1993; FOWLER *et al.*, 1974; KATO *et al.*, 1999). De fato, as células

mioepiteliais parecem ter um papel importante suprimindo a proliferação e a invasão das células neoplásicas, apesar do mecanismo responsável permanecer desconhecido (YAMAGAMI *et al.*, 1996). Vários estudos indicam que os tumores complexos são menos invasivos e que é o componente epitelial maligno destes tumores, o responsável pela progressão local e sistêmica da doença (KURZMAN & GILBERTSON, 1986; ALLEN & MAHAFFEY, 1989).

O termo carcinosarcoma (NERURKAR *et al.*, 1989; ABURTO *et al.*, 1997; KOHLI *et al.*, 1998), tumor misto maligno (STRANDBERG & GOODMAN, 1974; BAKER & LUMSDEN, 1999; ZUCCARI *et al.*, 2001; TATEYAMA *et al.*, 2001), tumor metaplásico (OBERMAN, 1987; SILVERMAN, 1996; GUPTA, 1999; CASSALI, 2000; CATROPPO & LARA, 2001; BARTOW, 2002), carcinoma com metaplasia pseudossarcomatosa (MESA, 1988), entre outros, são as terminologias encontradas na literatura. Muitas vezes representam a mesma entidade neoplásica, mas nem sempre são referidas como as mesmas (CATROPPO & LARA, 2001), com comportamento biológico e implicações terapêuticas distintas (SCHMITT, 1994; GOBBI *et al.*, 1993). Essas confusões seriam evitadas com uma classificação geral e possíveis subclassificações, mesmo porque, há evidências, na literatura, que subtipos morfológicos de tumores complexos apresentam prognósticos diferentes. Em veterinária não existem trabalhos que procurem correlacionar elementos mais específicos destes tumores com o seu comportamento clínico.

A necrose esteve presente em 33% dos tumores, principalmente nos tumores do tipo simples (62%).

A presença de necrose, nos tecidos tumorais, denota grande velocidade de crescimento das células neoplásicas, significando clinicamente tumores mais anaplásicos e com maior capacidade de embolização e metastatização, desse modo o prognóstico é pior associada à presença de necrose (SILVERMAN, 1991; MacEWEN & WITHROW, 1996; FRANCO, 1997). Neste tipo de morte celular, a ruptura celular libera no tecido vizinho o conteúdo celular, rico em proteases e outras substâncias tóxicas. Além da toxicidade direta para as células vizinhas, o

derrame gera substâncias que atraem células do sistema imune, causando intensa reação inflamatória, em especial neutrófilos e macrófagos (GOMPEL *et al.*, 2001).

As pacientes com tumores apresentando áreas pseudosarcomatosas têm prognóstico pior que aqueles com componente epitelial somente, devido ao comportamento mais agressivo desta neoplasia (MESA, 1988). Dez animais vieram a óbito ou pela solicitação de eutanásia pelo proprietário ou devido à morte natural decorrente ao estágio avançado da doença. Destes animais, três eram portadoras de tumores com componentes heterólogos, sugerindo desta forma seu potencial maligno. Contribuem para esta alta mortalidade o avançado estadiamento da doença no momento em que as mulheres e as cadelas são submetidas ao primeiro tratamento. Em geral, 50% dos casos são diagnosticados em estágios avançados, III e IV (FIGUEROA *et al.*, 1993; BRASIL, 1998).

Em Medicina Veterinária é cada vez mais importante prever o prognóstico de um animal com doença oncológica. Desta forma podem iniciar-se novas modalidades terapêuticas, se aconselhadas, ou não proceder a qualquer tratamento, evitando assim custos desnecessários.

O prognóstico deve ser baseado em parâmetros que sejam indicadores válidos. Os parâmetros mais fidedignos, classicamente aceitos, são: o tamanho do tumor; a invasão dos gânglios linfáticos regionais; o grau nuclear; o estágio clínico e o índice mitótico (MOULTON, 1990; MacEWEN & WITHROW, 1996; PÉREZ ALENZA *et al.*, 1997).

Estudo com animais evidenciaram que o índice mitótico e o grau histológico apresentaram associação estatisticamente significativa com a sobrevida total. O índice de proliferação é classicamente aceito como um bom indicador de prognóstico (COLLAN & HAAPASALO, 1991), sendo vários os estudos em Medicina Humana que comprovam estes resultados (KESHGEGIAN & CNAAN, 1995; JACQUEMIER *et al.*, 1998; KATO *et al.*, 1999).

Em relação ao grau histológico, os animais com tumores de elevado pleomorfismo foram os que tiveram menor sobrevida total, o que está em concordância com o observado em tumores mamários caninos por outros autores (KURZMAN & GILBERTSON, 1986; PÉREZ ALENZA *et al.*, 1997).

Não houve associação significativa do IP e IAPOP com relação as pacientes linfonodo-positivo. Contudo, foi possível diagnosticar 11 animais linfonodo positivo, sendo cinco no estágio III e seis casos no estágio IV. Existe uma disparidade de resultados no que se refere ao valor de biomarcador prognóstico do PCNA e caspase-3 para pacientes portadoras de câncer de mama com envolvimento de linfonodo. Vale ressaltar que grande parte não apresenta correlação positiva com o envolvimento de linfonodo como descrito por OKAMURA *et al.* (1997); HORIKUCHI *et al.* (1998); VILLAR *et al.* (2001) e FERREIRA *et al.* (2003).

O estágio clínico é um bom indicador prognóstico, por estar relacionado de forma altamente significativa com a sobrevida total de acordo com estudos realizados por MISDORP & HART (1976) e YAMAGAMI *et al.* (1996), em Veterinária. Para o correto estadiamento clínico é necessária informação acerca do grau de invasão dos gânglios linfáticos regionais. Os nossos dados reforçam a tese de que nos animais, à semelhança do que acontece nos humanos, os gânglios linfáticos regionais devem ser sempre removidos na mastectomia para análise histológica, o que permite a detecção de metástases ou micrometástases ganglionares.

O PCNA (clone PC10) é um dos marcadores de proliferação celular mais usados para obter informação acerca da cinética celular (TAHAN *et al.*, 1993; SARLI *et al.*, 1994; PREZIOSI *et al.*, 1995; MARINHO *et al.*, 1997). A sua utilidade tem sido demonstrada em Medicina Humana (ISOLA *et al.*, 1990; YANG *et al.*, 1996; CHU *et al.*, 1998; KOCOVÁ *et al.*, 1998; NIEWIADOMSKA *et al.*, 1998; HASEB *et al.*, 1999; TYNNINEN *et al.*, 1999) e em Medicina Veterinária (SARLI *et al.*, 1994; SARLI *et al.*, 1995; PREZIOSI *et al.*, 1995; PEÑA *et al.*, 1998). O PCNA tem uma semi-vida relativamente longa (20h), permanecendo nas células que acabaram de abandonar o ciclo celular (YU & FILIPE, 1993; SARLI *et al.*, 1994). O PCNA também apresenta expressão em células não cíclicas, nas quais estejam a decorrer fenômenos de reparação de DNA (COLTRERA & GROWN, 1991; WILSON *et al.*, 1992). Frente a isso, só foram contadas as células fortemente positivas.

De acordo com algumas observações em Medicina Veterinária (PREZIOSI *et al.*, 1995; SARLI *et al.*, 1995; LÖHR *et al.*, 1997; PEÑA *et al.*, 1998) e com inúmeros estudos em Medicina Humana (ISOLA *et al.*, 1990, HASEBE *et al.*, 1999; TYNNINEN *et al.*, 1999), verificamos a presença de uma marcação intratumoral fortemente heterogênea. A positividade nas áreas cartilaginosas foi menos frequente e intensa, portanto atenção maior foi dada nas neoformações epiteliais nestes casos.

Apesar de não haver diferença significativa do IP e graduação histológica, foi possível observar maiores expressões nos graus menos diferenciados, o que está de acordo com a literatura (HORIKUCHI *et al.*, 1998).

De fato, muitas neoplasias afetam com mais frequência animais de determinada idade, raça e sexo, sendo que estas informações auxiliam no diagnóstico. Neste estudo, os dados clínicos-epidemiológicos correspondem aos atualmente encontrados na literatura, sendo fêmeas, SRD, portadoras de câncer de mama e em relativa frequência em estágios avançados, os quais provaram ser os mais agressivos, determinados pela graduação histológica e por marcadores celulares de proliferação e apoptose, como relatado por GILBERTSON *et al.* (1998).

A amostragem da lesão foi eficaz no diagnóstico histopatológico e imunoistoquímico. No entanto, notou-se necessidade de amostragem mais representativa dos diversos subtipos de carcinomas e graus de malignidade para melhor análise associativa desse critério com os demais estudados (histopatológico e imunoistoquímico).

Deste estudo emergem como potenciais fatores de prognóstico não apenas as características clínico-patológicas clássicas (tamanho do tumor, ulceração cutânea, invasão ganglionar, estágio clínico) como também fatores de natureza molecular (índice proliferativo medido pelo PCNA e índice de apoptose pela caspase-3) que poderão revelar uma ajuda imprescindível na avaliação do prognóstico de um animal com câncer de mama.

CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos, nas condições em que foi realizado o experimento, permite as seguintes conclusões:

- São cadelas com idade superior a seis anos e não castradas portadoras de câncer de mama;
- Foi possível associar os índices de proliferação e apoptose, avaliados pela técnica de imunoistoquímica, aos tipos histológicos e estágios das neoplasias mamárias em cadelas SRD;
- A imunomarcção de células em apoptose mostrou correlação com alterações clínico-patológicas: estágio clínico e ulceração;
- Apesar da não diferença significativa, a associação do índice de proliferação variou de acordo com o tipo e graduação histológica do tumor de mama.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AALTOMAA S.; LIPPONEN P.; SYRJANEN K. Prognostic value of cell proliferation in breast cancer as determined by proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining. **Anticancer Res**, 12(4):1281-6, 1992.
- ABURTO F.E. *et al.* Histogenesis of mixed tumours in the canine mammary gland. **Veterinaria Mexico**, v. 28, p. 317-24, 1997.
- ALLEN S.W., MAHAFFEY E.A. Canine mammary neoplasia: prognostic indicators and response to surgical therapy. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.25: 540-546 1989.
- ALLEN S.W., PRASSE K.W., MAHAFFEY E.A. Cytologic differentiation of benign from malignant canine mammary tumors. **Vet. Pathol.**, v.23, p. 649-55, 1986.
- ALTUCCI L., GRONEMEYER H. Nuclear receptors in cell life and death. **Trends Endocrinol Metab**, New York, v.12, p.460-468, 2001.
- AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER (AJCC). **Manual for staging for breast carcinoma**, 3.ed. 1989.
- AZIZ S.A., PERVEZ S., KHAN S. M., KAYANI N., NASIR M.I. Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in infiltrating ductal carcinoma breast. **J Coll Physicians Surg Pak.**, v.15(4):225-9, 2005.
- BAKER R., LUMSDEN J.H. Principles of cytological evolution. In: _____. **Color atlas of cytology of dog and cat**. St. Louis: Mosby, 1999. p. 3-5.
- BALKWILL F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? **Cytokine & Growth Factor Reviews**, London, v.13, p.135-141, 2002.

- BALLARD B.R. Energy balance, anthropometry, and cancer. In: HEBER D., BLACK BURN G.L., GO V.L.W. **Nutricional oncology**. San Diego: Academic Press, 1999. p.137-51.
- BARTOW S.A. A mama. In: RUBIN E., FARBER J.L. **Patologia**. 3.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. cap. 19, p. 994-1013.
- BERGHE W.V., VERMEULEN L., WILDE G.D., BOSSCHER K.D., BOONE E., HAEGEMAN G. Signal trasduction by tumor necrosis factor and gene regulation of the inflammatory cytokine interleukin-6. **Biochem Pharmacol**, Tarrytown, v.60, p.1185-1195, 2000.
- BERTAGNOLLI A.C., CASSALI G.D., COSTA F.A., FERREIRA E., GONÇALVES P.B.D. Expressão Imuno-histoquímica de p63 e p53 em Tumores Mamários Mistos de Cadelas. **Prática Hospitalar**, São Paulo, v. VII, n. 44, p. 96-97, 2006.
- BIRKIMER S.J. Nutrition and breast disease. In: DONEGAN W.L., SPRATT J.S. **Cancer of the breast**. 3.ed. Philadelphia: Saunders, 1988. cap.5, p.74-104.
- BOSTOCK D.E. Canine and feline mamary neoplasms. **Br Vet J**, v.142: 506-515, 1986.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer/ INCA. Coordenação de Programas de Controle do Câncer/ Pro-Onco. **Câncer no Brasil: dados de registro de base populacional**. Rio de Janeiro: INCA/ Pro-Onco, 1991. 35p. Disponível em: <[http:// www. cancerdemama.org](http://www.cancerdemama.org)>. Acesso em: 10 jan. 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. União Internacional Contra o Câncer. **TNM: classificação dos tumores malignos**. 5.ed., Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer – INCA, 1998. p.128-36.
- BREGUNCI G.C., CALIARI M.V., FERREIRA E., VITORINO S., CASSALI G.D. Análise da expressão de metalotioneína em carcinomas ductais e metaplásicos da glândula mamária da cadela. In: Encontro Nacional de Patologia Veterinária, 11, 2003, Botucatu. **Anais...** Botucatu:Unesp, 2003. p. 209-209.
- BRODEY R.S., GOLDSCHMIDT M.H., ROSZEL J.R. Canine mammary gland neoplasms. **J Am Anim Hosp Assoc**, v.19: 61-90, 1983

- BREARLEY M.J. Mammary gland tumors in the dog. **In Practice**, v.11: 248-253, 1989.
- BUDIHNA et al., 1995. Prognostic value of total cathepsin B in invasive ductal carcinoma of the breast) . **Eur J Câncer**, 31A(5): 661-4, 1995.
- BURINI C.H.P. **Caracterização clínica, citopatológica e bioquímica do câncer mamário de cadelas sem raça definida**. 2002. 164 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- BURINI C.H.P., ROCHA N.S., HATAKA A. TNM clínico das neoplasias malignas mamárias em cadelas. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 10, 2001, Pirassununga. **Anais ... Pirassununga: USP**, 2001. p. 180.
- BURINI C.H.P., ROCHA N.S., SAITO M.E., KOHAYAGAWA A., RAHAL S.C., LIMA A.F.M. Avaliação do estado nutricional de cadelas com câncer de mama. **Braz J vet Res anim Sci**, v.41, 2004.
- BURINI C.H.P., BANDARRA E.P., ANDRADE F.H.E., ROCHA, N.S., LOT, R.F.E, MASSENO, A.P.B., CROCE, G.B., BATISTA, B.B.A., LAGOS, M.S. Aspectos epidemiológicos de neoplasia mamária em cães. In: Mostra científica, 9^a , 2006, Botucatu. **Anais ... Botucatu:Unesp**, 2006.
- BURKITT H.G., YOUNG B., HEATH J.W. **Wheater histologia funcional**. 3.ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1994. p.362-5.
- BUSSAB W.O.; MORETTIN, P.A. **Estatística básica** – 5 ed – São Paulo; Editora Saraiva, 526p., 2006.
- BYRNE K.L., DALGLEISH A.G., BROWNING M.J., STEWARD W.P., HARRIS A.L. The relationship between angiogenesis and the immune response in carcinogenesis and the progression of malignant disease. **Eur J Cancer**, New York, v. 36, p. 151-169, 2000.
- CARREÑO M.S.R., PEIXOTO S., GIGLIO A. Reposição hormonal e cancer de mama. **Rev Soc Bras Canc**, n.7, p.41-50, 1999.
- CARTER C.L. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24 740 breast cancer cases. **Cancer**, Philadelphia, v. 63, p. 181-7, 1989.

- CASSALI G.D., DUTRA A.P., FERREIRA E., GOMES L.R., GOBBI H., SCHIMITT F. Canine mammary tumors: comparative aspects with human breast cancer. *International Journal Of Molecular Medicine*. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 16, p. 64-64, 2005.
- CASSALI G.D. **Estudos morfológicos, imunohistoquímicos e citométrico de tumores mamários da cadela – aspectos comparativos com neoplasias da mama humana**. 2000. 73f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Patologia, Escola de Veterinária, UFMG.
- CASSALI G.D., SILVA P., RÊMA A. et al. A new methodology for the improvement of diagnostic immunohistochemistry in canine veterinary pathology: automated system using human monoclonal and polyclonal antibodies. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.53, p.326-331, 2001.
- CATROPPO J.F., LARA J.F. Metastatic metaplastic carcinoma of the breast (MCB): an uncharacteristic pattern of presentation with clinicopathologic correlation. **Diagn Cytopathol**, v. 25, p.285-91, 2001.
- CAVALCANTI M.F., CASSALI G.D., CARDOSO S.V., FERREIRA E., GOBBI H. Fatores Prognósticos na Abordagem Clínica e Histopatológica dos Carcinomas Mamários de Cadelas: Estadiamento TNM e Sistema de Nottingham. **Prática Hospitalar**, São Paulo, v. VIII, n. 44, p. 97-97, 2006.
- CAVALCANTI M.F., FERREIRA E., GOBBI H., CASSALI G.D. **Impacto do tamanho tumoral e envolvimento nodal em neoplasias malignas de mama em cadela**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, XII ENAPAVE- BELO HORIZONTE, v. 57, p. 93-93, 2005.
- CHENG J., LIN H., LIANG X. The relationship between prognosis, metastasis and microvessel quantity in invasive breast carcinoma. **Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi**, v.26(3):158-60, 1997.
- CHIARELLI I.M., CASSALI G.D., SCHMITT F. O tamanho da massa tumoral pode ser indicativo de diferenciação das neoplasias da mama da cadela. In: SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 9., 2000. **Anais...** Belo Horizonte : UFMG/Pró-Reitoria de pesquisa, 2000. p.95.

- CHU J.S., HUANG C.S., CHANG K.J. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolabeling as a prognostic factor in invasive ductal carcinoma of the breast in Taiwan. **Cancer Letters**, v.131, 145-152, 1998.
- CLIN D., DUFFLY M.J., WILLCOCKS T.C., GALLAGHER W., OTTIGGINS N. *p53* gene mutations in breast cancer. **Mod Pathol**, Baltimore, v.7, p. 14A, 1994.
- COLLAN Y., HAAPASALO H. The value of mitotic counting in the assessment of prognosis and proliferation in human tumours. **Journal of Pathology**, v.163: 361-364, 1991.
- COLTRERA M.D., GROWN A.M. PCNA/Ciclin expression and BrdU uptake define different subpopulations in different cell lines. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.39 (1): 23-30, 1991.
- COOPER G.M. **Oncogenes**. 2.ed. Boston : Jones and Barlett, 1995. 384p.
- COSTA S.D. et al. Factors influencing the prognostic role of oestrogen and progesterone receptor levels in breast cancer. **Eur J Cancer**, v.38, n.10, p1329-1334, 2002.
- COTRAN R.S., KUMAR V., ROBBINS S.L. **Patologia estrutural e funcional**. 6.ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2000. 1400p.
- COUTO C.G., NELSON R.W. Distúrbios da Glândula mamária. In: _____. **Fundamentos de medicina interna de pequenos animais**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1994. cap.57, p.490-1.
- CRAFT P.S., HARRIS A.L. Clinical prognostic significance of tumour angiogenesis. **Annals of Oncology**, v.5: 305-311, 1994.
- CRICHTON M.B., NICHOLS J.E., ZHAO Y., BULUN S.E., SIMPSON E.R. Expression of transcripts of interleukin-6 and related cytokines by human breast tumors, breast cancer cells, and adipose stromal cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Dallas, v. 118, p.215-220, 1996.
- CUMMINQS M.C., FURNIVAL C.M., PARSONS P.G., TOWNSEND E. PCNA immunostaining in breast cancer. **Aust N Z J Surg**, 63(8):630-6, 1993.

- CURRAN S., MURRAY G.I. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. **Eur J Cancer**, New York, v. 36, p. 1621-1630, 2000.
- DAS U.N. Is obesity an inflammatory condition? **Nutrition**, Norwood, v.17, p. 953-966, 2001.
- DELFINO A.B. et al. O envolvimento de genes e proteínas na regulação da apoptose – carcinogênese. **Rev Bras Cancerol**, v.43, n.3, p.173-186, 1997.
- DENG C., BRODIE S.G. Knockout mouse models and mammary tumorigenesis. **Cancer Biol**, v.11, p.387-394, 2001.
- DODD L.G., LAYFIELD L.J. Fine needle aspiration of inflammatory carcinoma of the breast. *Diagn. Cytopathol*, v. 15, p. 363-6, 1996.
- DOMOGALA W., HAREZGA B., SZADOWSKA A., MARKIEWSKI M., WEBWE K., OSBORN M. Nuclear *p53* protein accumulates preferentially ductal but rarely lobular breast carcinomas. **Am J Pathol**, Philadelphia, v. 142, p. 669-674, 1993.
- DONEGAN W.L. Diagnosis. In: DONEGA, W.L., SPRATT J.S. **Cancer of the breast**. 3.ed. Philadelphia: Saunders, 1988. cap. 6, p.125-166.
- DONEGAN W.L., SPRATT J.S. Multiple primary cancers in mammary and extramammary sites and cancers metastatic to the breast. In: _____. **Cancer of the breast**. 3.ed. Philadelphia: Saunders, 1988. cap. 22, p.632-47.
- DORN C.R, Priester W.A. **Epidemiology**. In Theilen and Madewell Eds. Veterinary Cancer Medicine 2º Ed. Philadelphia: Lea and Febiger,; 27-52, 1987.
- DUNLOP R.J., CAMPBELL C.W. Cytokines and advanced cancer. **J Pain Symptom Manage**, New York, v. 20, p. 214-232, 2000.
- DYCE K.M., SACK W.O., WENSING C.J.G. **Tratado de anatomia veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1996. p.289-91.
- EISENBERG A.L.A., KOIFMAN S. Aspectos gerais dos adenocarcinomas de mama, estadiamento e classificação histopatológica com descrição dos principais tipos. **Rev Bras Cancerol**, v.46, p.63-77, 2000.
- ELSE R.W., HANNANT D. Some epidemiological aspects of mammary neoplasia in the bitch. **Vet Rec**, v.104, p.296-304, 1979.

- ENGSTRÖM W. MÖLLERMARK G., KÄNGSTRÖM L.E., LARSSON O. Some molecular characteristics of canine mammary tumors and their relationship to biological malignancy and prognosis. **Zoological Science**, 6: 15-18, 1989.
- EVANS H.E., CHRISTENSEN G.C. The reproductive organs. In: EVANS H. E. **Miller's anatomy of the dog**. 3.ed. Philadelphia: Saunders, 1993. p.504-58.
- FERGUSON H.R. Canine mammary tumors. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.15: 502-511, 1985.
- FERNANDEZ Y., GU B., MARTINEZ A., TORREGROSA A., SIERRA A. Inhibition of apoptosis in human breast cancer cells: role in tumor progression to the metastatic state. **Int J Cancer**, New York, v.101, p. 317-326, 2002.
- FERREIRA E., DANTAS W., COURA A.P., ALVARENGA D.C. Cancer de mama: a importância do diagnóstico precoce. **Diário de Itabira**, v. 3501, p. 4 - 4, 22, 2006.
- FERREIRA E., BREGUNCI G.C., SCHMITT F.C., CASSALI G.D. Protocol for the anatomopathological examination of canine mammary tumors. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.55 no.1, 2003a.
- FERREIRA E., PINTO A.D., AZEVEDO JR G.M., CASSALI G.D. **Metodos de avaliação da proliferação celular em tumores mamários caninos: contagem de mitoses e imuno-histoquímica para MIB-1**. In: Encontro Nacional de Patologia Veterinária, 2003, Botucatu. XI ENAPAVE, 2003. p. 270-270.
- FIDLER I.J., BRODEY R.S. The biological behavior of canine mammary neoplasms. **J.A.V.M.A.**, v.151: 1311-1318, 1967
- FIGUEROA J.A., YEL D., MCGUIRE W.L. Prognostic indicators in early breast cancer. **Am J Med Sci**, v. 305, p. 172-82, 1993.
- FOULKES W.D., ROSENBLATT J., CHAPPUIS P.O. The contribution of inherited factors to the clinicopathological features and behavior of breast cancer. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, New York, v.6, p.453-465, 2001.
- FOWLER E.H., WILSON G.P., KOESTNER A. Biological behavior of canine mammary neoplasms based on a histogenetic classification. **Vet Pathology**, v.11: 212-229, 1974.

- FOX S.B., LEEK R.D., WEEKES M.P., WHITEHOUSE R.M., GATTER K.C., HARRIS A.L. Quantitation and prognostic value of breast cancer angiogenesis: comparison of microvessel density, Chalkley count, and computer image analysis. **J Pathol**, v.177, 275-283, 1995.
- FRANCO J.M. **Mastologia: formação do especialista**. São Paulo: Atheneu, 1997. p.167-70.
- GAGO et al. Integration of estrogen and progesterone receptors with pathological and molecular prognostic factors in breast cancer patients. **J Steroid Biochem Mol Biol**, 1998, 67 (5-6): 431-7, 1998.
- GALIZIA M.S., WAITZBERG D.L. Mecanismos de ação dos radicais livres e antioxidantes. **Rev Bras Nutr Clin**, v.16, p.79-89, 2001.
- GATENBY R.A., FRIEDEN B.R. Application of information theory and extreme physical information to carcinogenesis. **Cancer Research**, v.62, p. 3675-84, 2002.
- GERALDES M., GÄRTNER F., SCHMITT F.N. A immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours. **Vet Rec**, v.146, p.1140- 1148, 2000.
- GETTY R. Órgãos genitais femininos. In: _____. **Anatomia dos animais domésticos**. 5.ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1981. v.2, p.1489-93.
- GILBERTSON S.R., KURZMAN I.D., ZACHRAU R.E., HURVITZ A.I., BLACK M.M. Canine mammary epithelial neoplasms: biological implications of morphological characteristics assessed in 232 dogs. **Vet Pathology**, 20: 127-142, 1983.
- GOED V., FLECKENSTEIN G., DIETRICH M., OSMERS R.G.W., KUHN W., AUGUSTIN H.G. Prognostic value of angiogenesis in mammary tumors. **Anticancer Res**, v.18: 2199-2202, 1998.
- GOEL M.M., GOEL R., MEHROTRA A., NATH P., AGARWAL P.K., SINGH K., MEHROTRA R. Immunohistochemical localization and correlation of p53 and PCNA expression in breast carcinoma. **Indian J Exp Biol**, v.38(3): 225-30, 2000.
- GOMPEL A., LEVY D., CHAOUAT M., FORGEZ P., ROSTENE W. Apoptosis and aging: breast cells and apoptosis. **Maturitas**, Linerick, v.38, p.39-44, 2001.

- GOBBI H., RIBEIRO G.J.C., LOUREIRO F.J. Modelo de protocolo informatizável para estudo anátomo-patológico de peças cirúrgicas de mama. **J Anatomopatol**, v. 8, p.14-6, 1993.
- GOMES L.R., MOREIRA J.D., FERREIRA E., GOBBI H., CASSALI J.D. Correlação entre expressão de E-caderina, tipo e grau histológico em tumores de mama de cadela. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 11., 2003, Botucatu. **Anais...** Botucatu: UNESP, 2003. p.233.
- GOMPEL A., LEVY D., CHAOUAT M., FORGEZ P., ROSTENE W. Apoptosis and aging: breast cells and apoptosis. **Maturitas**, Linerick, v.38, p.39-44, 2001.
- GRAHAM J.C., MYERS R.K. The prognosis significance of angiogenesis in canine mammary tumors. **Vet Internal Medicine**, v.13:416-418, 1999.
- GREENWALD P. Role of dietary fat in the causation of breast cancer: point. **Cancer Epidemiol Biomark Prev**, v.8, p.3-7, 1999.
- GREENWALD P., CLIFFORD C.K., MILNER J.A. Diet and cancer prevention. **Eur J Cancer**, v. 37, p. 948-65, 2001.
- GUPTA R.K. Cytodiagnostic patterns of metaplastic breast carcinoma in aspiration samples: a study of 14 cases. **Diagn Cytopathol**, v.20, p. 10-2, 1999.
- GUYTON A.C. **Tratado de fisiologia médica**. 8.ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1991. 864p.
- HAERSEV T., JACOBSEN G.K. Proliferating cell nuclear antigen in breast carcinomas. An immunohistochemical study with correlation to histopathological features and prognostic factors. **Virchows Arch**, v.424(1):39-46, 1994.
- HAMILTON J.M., ELSE R.W., FORSHAW P. Oestrogen receptors in canine mammary tumours. **Vet Rec**, v.101, p.258-260, 1977.
- HAMPE J.F., MISDORP W. Tumours and displasias of the mammary gland. **Bulletin of the world Health Organization**, v.50: 111-133, 1974.
- HARIGOPAL M., BERGER A.J., CAMP R.L., RIMM D.L., KLUGER H.M. Automated quantitative analysis of E-cadherin expression in lymph node

- metastases is predictive of survival in invasive ductal breast cancer. **Clin cancer Res**, v.11(11):4083-9, 2005
- HARVEY J. Glândulas mamárias. In: BOJRAB M. J. **Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais**. 3.ed. São Paulo: Roca, 1996. p.425-30.
- HASEBE T., SASAKI S., IMOTO S., OCHIAI A. Proliferative activity of intratumoral fibroblasts is closely correlated with lymph node and distant organ metastases of invasive ductal carcinoma of the breast. **Am J Pathol**, v.156(5):1701-10, 2000.
- HASEBE T., IMOTO S., SASAKI S., TSUBONO Y., MUKAI K. Proliferative activity and tumor angiogenesis is closely correlated to stromal cellularity of fibroadenoma: Proposal fibroadenoma, cellular variant. **Pathology International**, v.49, 435-443, 1999.
- HEATON P.R. *et al.* Role of dietary antioxidants to protect against DNA damage in adult dogs. **J Nutr**, v.132, p. 1720S-4S, 2002.
- HEIMANN R., FERQUSON D., RECANT W.M., HELLMAN S. Breast cancer metastatic phenotype as predicted by histologic tumor markers. **Cancer J Sci Am**, 3(4):224-9, 1997.
- HELLMÉN E., BERGSTROM R., HOLMBERG L., SPANGBERG I.B., HANSSON K., LINDGREN A. Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. **Veterinary Pathology**, v.30: 20-27, 1993.
- HENDERSON B.E., FEIGELSON H.S. Hormonal carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v.21, n.3, p.427-433, 2000.
- HENDERSON B.E., ROSS R.K. Prevention of hormone-related cancers: a delicate balance. **Helix Amgen's Magaz of Biotech**, v.1, p.5-11, 1996.
- HENDERSON B.E., ROSS R.K., PIKE M.C. Toward the primary prevention of cancer. **Science**, v.252, p.1131-1138, 1991.
- HENDERSON B.E., ROSS R.K., BERNSTEIN L. Estrogens as a cause of human cancer. **Cancer Res**, v.48, p.246-253, 1988.
- HORIKUCHI J., IINO Y., TAKEY H., MAEMURA M., TAKEYOSHI I., YOKOE T., OHWADA S., OYAMA T., NAKAJIMA T., MORISHITA Y. Long-term prognostic

- value of PCNA labeling index in primary operable breast cancer. **Oncol Rep**, v.5(3):641-4, 1998.
- HORIQUCHI J., IINO Y., TAKEY H., MORISHITA Y, NAKAJIMA T. Expression of proliferating cell nuclear antigen in invasive ductal carcinoma of the breast. **Jpn J Clin Oncol**, v.24(2):79-84, 1994.
- HUANG P., OLIFF A. Signaling pathways in apoptosis as potencial targets for cancer therapy. **Trends Cell Biol**, Cambridge, v.11, p.343-348, 2001.
- INGVARSSON S. Breast cancer: introduction. **Cancer Biol**, v.11, p.323-326, 2001.
- ISOLA J., KALLIONIEMI O.P., KORTE J.M., WAHLSTROM T., AINE R., HELLE M., HELIN H. Steroid receptors and Ki-67 reactivity in ovarian cancer and in normal ovary: correlation with DNA flow cytometry, biochemical receptor assay, and patient survival. **J Pathol**, 162, 295-301, 1990.
- JACQUEMIER J.D., PENAULT-LLORCA F.M., BERTUCCI F., SUN Z.Z., HOUVENAEGHEL G.F., GENEIX J.A., PUIG B.D., BARDOU V.J., HASSOUN J.A., BIRNBAUM D., VIENS P.J. Angiogenesis as a prognostic marker in breast carcinoma with conventional adjuvant chemotherapy: a multiparametric and immunohistochemical analysis. **Journal of Pathology**, v.184: 130-135, 1998.
- JERICÓ M.M., SCHEFFER K.C. Aspectos epidemiológicos dos cães obesos na cidade de São Paulo. **Clin Vet**, n.37, p. 25-9, 2002.
- KALOGERAKE A., TZARDI M., DATSERIS G., KANAVAROS P., KARVELAS C., CHALKIADAKIS G., TSIFTIS D., DELIDES G. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in patients with breast carcinoma in comparison to patients with benign breast diseases. **In vivo**, v.8(6):1053-6, 1994.
- KATO T., KAMEOKA S., KIMURA T., NISHIKAWA T., KOBAYASHI M. C-erbB-2 and PCNA as prognostic indicators of long-term survival in breast cancer. **Anticancer Res**, v.22(2B):1097-103, 2002.
- KATO T., KIMURA T., ISHII N., FUJII A., YAMAMOTO K., KAMEOKA S., NISHIKAWA T., KASAJIMA T. The methodology of quantitation of microvessel density and prognostic value of neovascularization associated with longterm survival in japanese patients with breast cancer. **Breast Cancer Res**, Treat.; 53: 19-31, 1999.

- KAUFMANN S.H., HENGARTNER M.O. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. **Trends Cell Biol**, Cambridge, v.11, p.526-534, 2001.
- KESHGEGIAN A.A., CNAAN A. Proliferation markers in breast carcinoma. Mitotic figure count, s-phase fraction, proliferatin cell nuclear antigen, Ki67 and MIB-1. **American Journal of Clinical Pathology**, v.104 (1): 42-49, 1995.
- KLAUBER D.M.N., VAN-ZEE K.J., LINKOV I., BORGEN P.I., GERALD W.L. Biological behavior of human breast cancer micrometastases. **Clin Cancer Res**, Philadelphia, v.7, p.2434-2439, 2001.
- KOCOVA L., SKALOVAA FAKAN F., ROUSAROVA M. Phylloides tumour of the breast: immunohistochemical study of 37 tumours using MIB1 antibody. **Pathology Research and Practice**, v.194, 97-104, 1998.
- KOJIMA H. et al. Apoptosis of pregnancy-dependent mammary tumor and transplantable pregnancy-dependent mammary tumor in mice. **Cancer Lett**, v.110, p.113-121, 1996.
- KOHLI R.N., SAIYARI M., NADDAF H., et al. Malignant mixed mammary tumour of unusually large size in a bitch. **India Vet J**, v.75, p. 113-116, 1998.
- KOUTSELINI H., MARKOPOULOS C., LAMBROPOULUS S., GOGAS H., KANDARAKI C., GOGAS J. Relationship of epidermal growth factor receptor (EGFR), proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and vimentin expression and various prognostic factors in breast cancer patients. **Cytopathology**, v.6(1):14-21, 1995.
- KOVACS E. Investigation of interleukin-6 (IL-6), soluble IL-6 receptor (sIL-6R) and soluble gp 130 (sgp 130) in sera of cancer patients. **Biomed Pharmacother**, Kirschweg, v.55, p. 391-396, 2001.
- KURZMAN I., GILBERTSON S.R. Prognostic factors in canine mammary tumors. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery**, v.1 (1): 25-32, 1986.
- LEIS H.P., URBAN, J.A. The other breast. In: GALLAGER H.S., LEIS H.P., SNYDERMAN R.K., et al. **The breast**. Saint Louis: Mosby. 1978. cap. 40, p. 487-96.
- LEONG A.S.Y., WRIGHT J. The contribution of immunohistochemical staining in tumor diagnosis. **Histopathology**, v.11, p.11295-11305, 1987.

- LESLIE K.O., HOWARD P. Oncogenes and antioncogenes in human breast carcinoma. **Pathol Annu**, v. 27, p. 321, 1992.
- LINDERHOLM B.K., LINDH B., BECKMAN L., ERLANSON M., EDIN K., TRAVELIN B., BERGH J., GRANKVIST K., HENRIKSSON R. Prognostic correlation of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in 1307 primary breast cancers. **Clin Breast Cancer**, v.4(5), p.340-7, 3003.
- LIU S., EDGERTON S.M., MOORE D.H., THOR A.D. Measures of cell turnover (proliferation and apoptosis) and their association with survival in breast cancer. **Clin Cancer Res**, Philadelphia, v.7, p.1716-1723, 2001.
- LOCOPO N., FANELLI M., GASPARINI G. Clinical significance of angiogenic factors in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v.52:159-173, 1998.
- LOHR C.V., TEIFKE J.P., FAILING K., WEISS E. Characterization of the proliferation state in canine mammary tumours by the standardized AgNOR method with postfixation and immunohistologic detection of Ki-67 and PCNA. **Vet Pathology**, v.34: 212-221, 1997.
- LOURO I.D. Oncogenética. **Rev Soc Bras Canc**, n.11, p.36-42, 2000.
- LUOTTO, R. et al. Plasma-prolactin in human breast cancer. **Lancet**, p.433-434, 1997.
- MacDONALD N., ALEXANDER R., BRUERA E. Cachexia-anorexia-asthenia. **J Pain Symptom Manage**, New York, v.10, p.151-155, 1995.
- MacEWEN E.G., WITHROW S.J. Tumors of the mammary gland. In **Small Animal Clinical Oncology** W. B. Saunders Company; 356-373, 1996.
- MARINHO A., SOARES R., FERRO J., LACERDA M., SCHMITT, F.C. Angiogenesis in breast cancer is related to age but not to other prognosis parameters. **Pathol Res Pract**, v.193: 267-273, 1997.
- MAREEL M., LEROY A. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. **Physiol Rev**, v.83, p.337-376, 2003.

- MARIUZZI G., SISTI S. Multivariate quantitative histopathological assessment of prognostic factors in ductal infiltrating breast carcinoma. **In vivo**, v.7(4):357-61, 1993.
- MARTINS A.M.C.R.P.F., TAMASO E., GUERRA J.L. Retrospective review and systematic study of mammary tumors in dogs and characteristics of the extracellular matrix. **Braz J Vet Res Anim Sci**, v.39, n 1, São Paulo, 2002.
- MATHÉ G. Obesity not only holds cardiovascular disease, it also hold tumors. **Biomed Pharmacother**, v.54, p. 67-8, 2000.
- McKINNELL R.G. Cancer genetics. In: McKINNELL et al. (Ed.). **The biological basis of cancer**. Cambridge : Cambridge University, 1998. p.79-114.
- McTIERNAN A. Associations between energy balance and body mass index and risk of breast carcinoma in woman from diverse racial and ethnic backgrounds in the U.S. **Cancer**, v. 88, p. 1248-55, 2000.
- MENDONÇA M. *et al.* Receptores hormonais. **J. Bras. Ginecol.**, v.102, p.233-9, 1992.
- MERSIN H., YILDRIM E., GULBEN K., BERBEROGLU U. Is invasive lobular carcinoma different from invasive ductal carcinoma? **Eur J Surg Oncol**, v.29(4):390-5, 2003.
- MESA C.M.P. Gross and microscopic pathology. In: DONEGAN W.L., SPRATT J.S. **Cancer of the breast**. 3.ed. Philadelphia: Saunders, 1988. cap. 6, p. 125-66.
- MEUTEN D.J. **Tumors in domestic animals**. 4.ed. Iowa State : Univ. California, 2002. 788p.
- MILLER W.R. Oestrogens and breast cancer: biological considerations. **Br Med Bul**, v.47, p.470-483, 1991.
- MISDORP W., ELSE R.W., HELLMÉN E., *et al.* Definitions and explanatory notes. In: _____. **WHO histological classification of mammary tumors of the dog and cat**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology. 1999. cap. 3, p. 18-27.

- MISDORP W. Canine mammary tumours: protective effect of late ovariectomy and stimulating effects of progestins. **Vet Q**, v.10, p. 26-33, 1988.
- MISDORP W., HART A.A. Prognostic factors in canine mammary cancer. **Journal of the National Cancer Institute**; 56 (4): 779-786. 1976.
- MISDORP W., COTCHIN E., HAMPE J.F., JABARA A.G., VON SANDERSLEBEN J. Canine malignant mammary tumours. III. Special types of carcinomas, malignant mixed tumors. **Vet Pathol**, v.10: 241-256, 1973.
- MOL J.A., GARDEREN E.V., RUTTEMAN G.R., *et al.* New insights in the molecular mechanism of progestin-induced proliferation of mammary epithelium: induction of the local biosynthesis of growth hormone (GH) in the mammary gland of dogs, cats and humans. **J of Steroid Biochem Mol Biol**, v. 57, p. 67-71, 1996.
- MOL J.A. *et al.* The role of progestins, insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding proteins in the normal and neoplastic mammary gland of the bitch: a review. **J Reprod Fertil**, v.51, p.339-344, 1997.
- MONLUX A.W. *et al.* Classification of epithelial canine mammary tumors in a defined population. **Vet Pathol**, v.14, p.194-217, 1977.
- MOORE M.A. The role of chemoattraction in cancer metastases. **Bioessays**, Cambridge, v.23, p.674-676, 2001.
- MORENA A.M.L., OSHIMA C.T.F., GEBRIM L.H., EGAMI M.I., SILVA M.R.R., SEGRETO R.A., GIANNOTTI FILHO O, TEIXEIRA V.P.C., SEGRETO H.R.C. Early nuclear alterations and immunohistochemical expression of Ki-67, Erb-B2, vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor (TGF-BETA 1) and integrine-linked kinase (ILK) two days after tamoxifen in breast carcinoma. **Neoplasma**, República Tcheca, v.51, n.6, p. 481-486, 2004.
- MORRISON W.B. Paraneoplastic syndromes and the tumors that cause them. In: _____. **Cancer in dogs and cats**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1998. cap. 50, p.763-78.

- MORRIS J.S., DOBSON J.M., BOSTOCK D.E., O'FARRELL E. Effect of ovariectomy in bitches with mammary neoplasms. **The Veterinary Record**, v.148: 656-658, 1998.
- MORRISON W.B. **Cancers in dogs and cats. Medical and surgical management**. Philadelphia : Williams & Wilkins, 1998. 785p.
- MOTTOLESE M. et al. Spontaneous canine mammary tumors. **Lab Invest**, v.71, n.2 p.182-187, 1994.
- MOULTON J.E. Tumors of the mammary gland. In: _____. **Tumors in domestic animals**. 3.ed. Los Angeles: University of California Press, 1990. cap.12, p.518-52.
- MOULTON J.E., TAYLOR D.O.N., DORN C.R., *et al*. Canine mammary tumors. **Pathol. Vet.**, v. 7, p. 289-320, 1970.
- MULDOON T.G. Interplay between estradiol and prolactin in the regulation of steroid hormone receptor levels, nature, and functionality in normal mouse mammary tissue. **Endocrinol**, v.109, n.5, p.1339-1346, 1981.
- MUTO T., WAKUI S., TAKAHASHI H., MAEKAWA S., MASAOKA T., USHIGOME S., FURUSATO M. p53 gene mutations occurring in spontaneous benign and malignant mammary tumors of the dog. **Vet Pathol**, v.37(3):248-53, 2000.
- NARITA M., NAKAO K., NAKAHARA M., ONISHI A., TSUJIMOTO M. Independent prognostic factors in breast cancer patients. **Am J Surg**, v.175 (1): 73-75, 1998.
- NARITA T., FUNAHASHI H., SATOH Y., TAKAGI H. Proliferating cell nuclear antigen immunostaining in breast cancer and its relation to prognosis. **Jpn J Clin Oncol**, v.23(1):20-5, 1993.
- NERURKAR V.R., CHITALE A.R., JALNAPURKAR B.V., NAIK S.N., LALITHA V.S. Comparative pathology of canine mammary tumors. **J Comp Pathology**, v.101: 388-397, 1989.
- NERURKAR V.R., *et al*. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase activities in normal canine mammary gland and in

- mammary tumours and their correlation with oestrogen receptors. **J Comp Pathol**, v.102, p.191-195, 1990.
- NIEWIADOMSKA H., JEZIORSKI A., OLBORSKI B. The expression of the proliferating antigen Ki67, PCNA and products of suppressor gene p53 in primary invasive ductal breast carcinoma. **J Exp Clin Cancer Res**, v.17 (4): 503-509, 1998.
- NOGUEIRA C.R., BRENTANI M.M. Triiodothyronine mimics the effects of estrogen in breast cancer cell lines. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v.59, n.3/4, p.271-279, 1996.
- NORMAN A.W., LITWACK G. **Hormones**. 2.ed. San Diego: Academic, 1997. 558p.
- OBERLEY T.D. Oxidative damage and câncer. **Am J Pathol**, v.160, p. 403-8, 2002.
- OBERMAN H.A. Metaplastic carcinoma of the breast: a clinicopathologic study of 27 patients. **Am J Surg Pathol**, v. 11, p. 918-29, 1987.
- O'BRIEN D.J. Spatial and temporal comparison of selected cancers in dogs and humans, Michigan, USA, 1964-1994. **Prev Vet Med**, v. 47, p.187-204, 2000.
- OKAMURA K., KOBAYASHI I., MATSUO K., KIYOSHIMA T., YAMAMOTO K., MIYOSHI A., SAKAI H. Immunohistochemical localization of cathepsin D, proliferating cell nuclear antigen and epidermal growth factor receptor in human breast carcinoma analysed by computer image analyser: correlation with histological grade and metastatic behaviour. **Histopathology**, v.31(6):540-8 1997.
- OLIVEIRA I.S., CASSALI G.D., FERREIRA E. **Correlação entre a expressão de B-catenina e E-caderina em tumores de mama de cadela**. In: XIII semana de iniciação científica da UFMG, 2004, Belo Horizonte. XIII semana de iniciação científica da UFMG, 2004.
- OWUOR E.D., KONG A.T. Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. **Biochem Pharmacol**, Tarrytown, v.64, p.765-770, 2002.
- OWEN L.N. A Comparative Study of Canine and Human Breast Cancer. **Invest. Cell Pathol**, v.2: 257-275, 1979.

- OWEN L.N. TNM Classification of tumors in domestic animals. Ed. VPH/CMO/80.20, **W.H.O.**, Geneva, 1980.
- PARK C.S., JACOBSON N.L. Glândula mamária e lactação. In: _____. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. 11.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. cap. 37, p.645-59.
- PARODI A.L. Les elements du pronostic des cancers mammaires de la chienne. **Pratique Médical et Chirurgicale de L'Animal de Compagnie**, v.18 (2): 31-36., 1983.
- PELETEIRO M.C. Tumores mamários na cadela e na gata. **Rev Port Ciência Vet**, v.89, p.10-34, 1994.
- PENA L.L., NIETO A.I., PEREZ-ALENZA M.D., CUESTA P., CASTANO M. Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. **J Vet Diagn Invest**, v.10(3):237-46, 1998.
- PERATONI A.O. Carcinogenesis. In: McKINNELL et al. (Ed.). **The biological basis of cancer**. Cambridge : Cambridge Universty, 1998. p.75-114.
- PEREZ A.D., RUTTEMAN G.R., PENNA L., BEYNEN A.C., CUESTA P. Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lakewood, v.12, n. 3, p. 132-139, 1998.
- PÉREZ-ALENZA M.D. **Influencia de la nutricion, alteraciones genéticas y aspectos clínicos en los tumores mamarios caninos**. Tese de Doutoramento. Universidade complutense de Madrid, 1994.
- PÉREZ ALENZA M.D., PENNA L., NIETO A.I., CASTAÑO M. Clinical and pathological prognostic factors in canine mammary tumors. **Ann Ist Super Sanità**, v.33(4): 581-585, 1997.
- PINES J. Cyclins, CDKs and cancer. **Cancer Biol**, v.6, p.63-72, 1995.
- PINOTTI J.A., TEIXEIRA L.C. Câncer de mama: Importância, epidemiologia e fatores de risco. In: _____. **Tratado de ginecologia**. 3.ed., São Paulo: Roca, 2000. v.3, cap. 180, p.2019-22.

- PINTO A.C.B.C.F., IWASAKI M., FIGUEIREDO C., CORTOPASSI S.R.G., STERMAN F.A. Tomografia computadorizada do tórax de cadelas portadoras de neoplasias mamárias malignas. I -determinação da técnica do exame. **Braz J Vet Res Anim Sci**, v.43, n.1, p. 95-102, 2006.
- POLLER D.N., ROBERTS E.C., BELL J.A., ELSTON C.W., BLAMEY R.W., ELLIS I.O. *p53* protein expression in mammary ductal carcinoma in situ: relationship of estrogen receptor and *c-erbB-2* protein. **Hum Pathol**, Philadelphia, v.24, p. 463-8, 1992.
- PREZIOSI R., SARLI G., BENAZZI C., MARCATO P.S. Detection of proliferation cell nuclear antigen (PCNA) in canine and feline mammary tumours. **J Comp Pathology**, v.113, p.301-313, 1995.
- QUEIROGA F., LOPES C. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos factores de prognóstico. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.97(543), 119-127, 2002.
- RAHAL S.C. *et al.*, 1995. Uso da fluoresceína na identificação dos vasos linfáticos superficiais das glândulas mamárias em cadelas. **Ciênc. Rural**, v. 25, p. 251-4, 1995.
- RAY G.N., SHAHID M., HUSAIN S.A. Role of lipids, lipoproteins and vitamins in women with breast cancer. **Clin Biochem**, v.34, p. 71-6, 2001.
- RESTUCCI B., DEVICO G., MAIOLINO P. Evaluation of angiogenesis in canine mammary tumors by quantitative platelet endothelial cell adhesion molecule immunohisto-chemistry. **Vet Pathology**, v.37:297-301, 2000.
- ROSS M.H. *et al.* Sistema genital feminino. In: _____. **Histologia: texto e atlas**. 2.ed. São Paulo: Panamericana, 1993. cap.22, p.649-709.
- RUBIN E., FARBER J.L. Neoplasia. In: _____. **Patologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002. cap.5, p. 152-209.
- RUBIO N., ESPANA L., FERNANDEZ Y., BLANCO J., SIERRA A. Metastatic behavior of human breast carcinomas overexpressing the *Bcl-x (L)* gene: a role in dormancy and organospecificity. **Lab Invest**, Baltimore, v.81, p.725-734, 2001.

- RUTTEMAN G.R. Hormones and mamary tumor disease in the female dog : un update. **In Vivo**, v.4: 33-40, 1990.
- RUTTEMAN G.R., WITHROW S.J., MACEWEN E.G. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW S.J.; MACEWEN E.G. **Small animal clinical oncology**. 2.ed. Philadelphia : Sanders, 2001. p.455-477.
- SAIKUMAR P., DONG Z., MIKHAILOV V., DENTON M., WEINBERG J.M., VENKATACHALAN M.A. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. **Am J Med**, Newton, v.107, p.489-506, 1999.
- SARLI G., BENAZZI C., PREZIOSI R., MARCATO P.S. Assessment of proliferative activity by anti-PCNA mono-clonal antibodies in formalin-fixed, paraffin-embedded samples and correlation with mitotic index. **Vet Pathology**, v.32: 93-96, 1995.
- SARLI G., BENAZZI C., PREZIOSI R., MARCATO P.S. Proliferative activity assessed by anti-PCNA and Ki67 mono-clonal antibodies in canine testicular tumors. **J Comp Path**, v.110: 357-368, 1994.
- SAS. **User's Guide: basic and statistic**, Cary: SAS, 1999, 1686p.
- SCHNEIDER R., DORN C.R., TAYLOR D.O.N. Factors influencing canine mamary cancer development and postsurgical survival. **Cancer**, Hoboken, v.43, p. 1249-1261, 1969.
- SCHINEIDER R. Comparison of age, sex, and incidence rates in human and canine breast cancer. **Cancer**, v.26, n.2, p.419-426, 1970.
- SCHMITT F.C. Mama. In: BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo patologia**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.538-562.
- SCHMITT F.C. Prognóstico do cancro da mama: avaliação ao impacto de novos métodos face aos factores prognósticos tradicionais. **Arq Med**, v.8, p.319- 24, 1994.
- SCHMITT F C., PEREIRA E.M., ANDRADE L.M., TORRESAN M., deLUCCA L. The proliferating cell nuclear antigen index in breast carcinomas does not correlate with mitotic index and estrogen receptor immunoreactivity. **Pathol Res Pract**, v.190(8):786-91, 1994.

- SCHMITZ I., KIRCHHOFF S., KRAMMER P.H. Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. **Int J Biochem Cell Biol**, Tarrytown, v.32, p.1123-1126, 2000.
- SCHONDORF T., GOHRING U.J., BECKER M., HOOPMANN M., SCHMIDT T., RUTZEL S., REIN D.T., ULRICH U., FECHTELER R., BERSCH A., MALLMANN P., VALTER M.M. High apoptotic index correlates to p21 and p27 expression indicating a favorable outcome of primary breast cancer patients, but lacking prognostic significance in multivariate analysis. **Pathobiology**, v.71(4):217-22, 2004.
- SEEGER J., ALLEGRA J.C. Chemotherapy of breast cancer. In: DONEGAN W.L., SPRATT J.S. **Cancer of the breast**. 3.ed. Philadelphia: Saunders, 1988. cap., p. 475-91.
- SENIE R.T., ROSEN P.P., RHODES P., *et al.* Obesity at diagnosis of breast carcinoma influences duration of disease free survival. **Am. Int. Med.**, v. 116, p. 26-32, 1992.
- SHAO Z., JIANQ M., WU J., YU L., HAN Q., ZHANQ T., SHEN Z. Inhibition of spontaneous apoptosis in human breast cancer. **Chin Med Sci J**, v.11(4):200-3. 1996.
- SHEEN-CHEN S.M., ENQ H.L., CHOU F.F., CHEN W.J. The prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen in patients with lymph node-positive breast cancer. **Arch Surg**, v.132(3):264-7, 1997.
- SHULL R.M., MADDUX J.M. Subcutaneous glandular tissue: the mammary glands. In: COWELL, R.L., *et al.* **Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat**. 2.ed. St. Louis: Mosby, 1999. cap.7, p.88-96.
- SILVA A.E., SERAKIDES R., CASSALI G.D. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. **Ciência Rural**, v.34, n.2, p.625-633, 2004.
- SILVERMAN J.F. Breast. In: _____. **Comprehensive cytopathology**, 2.ed. Philadelphia: Saunders, 1996. p. 703-70.
- SILVERMAN J.F. Breast. In: BIBBO M. **Comprehensive cytopathology**. Philadelphia: Saunders, 1991. cap. 27, p.703-70.

- SIMEONOV R., STOIKOV D. Study on the correlation between the cytological and histological tests in the diagnostics of canine spontaneous mammary neoplasms. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v.9, n3, 211-219, 2006.
- SMYTH P.P.A. The thyroid and breast cancer: a significant association ? In: The Finnish Medical Society. **Ann Med**, v.29, p.189-191, 1997.
- SONNESCHEIN E.G., GLICKMAN L.T., GOLDSCHMIDT M.H., Body conformation, diet, and risk of breast cancer in pet dogs: a case-control study. **Am J Epidemiol**, v.133, p. 694-703. 1991.
- SORENMO K. Na update on canine mammary gland tumors. In: _____. ACVIM Forum, 16, 1998, S. L. **Proceedings** ... s.l. , 1998. p.387-8.
- SOUZA C.A., SERAKIDES R.O., CASSALI G.D., FERREIRA E., LEITE E.D., FREITAS E.S., OCARINO N.M. **Efeito da administracao de tiroxina na histomorfometria e na expressao de CDC-47 e de caspase-3 na glandula mamaria durante a gestacao, lactacao e ao desmame**. In: XV Semana de Iniciação Científica Conhecimento e Cultura, 2006, Belo Horizonte. CD-ROOM da XV Semana de Iniciacao Cientifica da UFMG., 2006.
- STONE E.A. Neoplasias da glândula mamária. In: BIRCHARD, S.J., SHERDING, R.G. **Manual Saunders de clínica de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 1998. p.234-7.
- STRANDBERG J.D., GOODMAN D.G. Breast cancer – Animal model: canine mammary neoplasia. **Am J Pathol**, v.75, n.1, p.225-228, 1974.
- STREIFF E.L. *et al.* A comparison of the nutritional adequacy of home-prepared and commercial diet for dogs. **J Nutr**, v. 132, p. 1688S-700S, 2002.
- STYLO T.M., WOOD W.C. Quimioterapia coadjuvante na paciente com câncer da mama e gânglios negativos. In: LOPES M.L. **Clínicas cirúrgicas da América do Norte**. Rio de Janeiro: Interlivros Edições, 1996. v.2, p.337-51.
- SUYAMA E., KAWASAKI H., TAIRA K. Identification of a caspase 3-independent role of pro-apoptotic factor *Bak* in *TNF- α* -induced apoptosis. **FEBS Lett**, Amsterdam, v.528, p.63-69, 2002.

- SZABO C. et al. Human, canine and murine BRCA1 genes: sequence among species. **Hum Mol Genet**, v.5, n.9, p.1289-1298, 1996.
- TAHAN S.R., NEUBERQ D.S., DIEFFENBACH A., YACOUN L. Prediction of early relapse and shortened survival in patients with breast cancer by proliferating cell nuclear antigen score. **Cancer**, v.71(11):3552-9, 1993.
- TATEYAMA S. et al. Expresión of bone morphogenetic protein-6 (BMP-6) in myoepithelial cells in canine mammary gland tumors. **Cancer Invest.**, v. 19, 692-7, 2001.
- TAVARES W.F., CARNEIRO R.A., CALDEIRA M.I.F., PEREIRA L.C., CASSALI G. D., FERREIRA E., LAVALLE G. Carcinoma Metaplásico da Glândula Mamária em um Macho da Espécie Canina. **Prática Hospitalar**, São Paulo, v. VIII, n. 44, p. 97-97, 2006.
- THOMAS M., NOQUCHI M., KITAGAWA H., KINOSHITA K., MIYAZAKI I. Poor prognostic value of proliferating cell nuclear antigen labelling index in breast carcinoma. **J Clin Pathol**, v.46(6):525-8, 1993.
- TISDALE M.J. Cancer anorexia and cachexia. **Nutrition**, Birmingham, v. 17, p.438-442, 2001.
- TOI M., INADA K., SUZUKI H., TOMINAGA T. Tumor angiogenesis in breast cancer: its importance as a prognostic indicator and association with vascular endothelial growth factor expression. **Breast Cancer Res Treat**, v.36: 193-204, 1999.
- TORRES L.N., HERNANDEZ-BLAZQUEZ F.J., MATERA J.M., VASCONCELOS C.H., DAGLI M.L.Z. Expressão de conexinas e de E-caderinas em glândulas mamárias hiperplásicas e neoplásicas de cães. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 11., 2003, Botucatu. **Anais...** Botucatu: UNESP, 2003. p.245.
- TRACEY K.J., CERAMI A. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. **Ann Rev Cell Biol**, v.9, p.317-43, 1993.
- TRENTAM D.A., NEWCOMB P.A., STORER B.E., et al. Body size and risk of breast cancer. **Am. J. Epidemiol.**, v. 145, p.1011-19, 1997.

- TYNNINEN O., VON BOGUSLAWSKI K., ARONEN H.J., PAAVONEN T.
Prognostic value of vascular density and cell proliferation in breast cancer patients. **Pathol Res Pract**, v.195 (1): 31-37, 1999.
- VALLANCE D.K., CAPEL-EDWARDS K. **Br Med J**, v. 24, p. .221, 1971.
- Van GARDEREN E., de WIT M., VOORHOUT W.F., RUTTEMAN G.R., MOE J. A., NEDERBRAIGT H., MISDORP W. Expression of grow hormone in canine mammary tissue and mammary tumours. Evidence for potencial autocrine/paracrine stimulatory loop. **Am J Pathol**, v.150, p. 1037-47, 1997.
- Van GARDEREN E., SCHALKEN J.A. Morphogenetic and tumorigenic potentials of mammary growth hormone/growth hormone receptor system. **Mol Cell Endocrinology**, v.197, p.153-65, 2002.
- VESLEY S.B., PERKS C.M., SEN C., CALDER C.J., HOLLY J.M., WINTERS Z.E. Himmunohistochemical expression of insulin-like growth factor binding protein-3 in invasive breast cancers and ductal carcinoma in situ: implications for clinicopathology and patient outcome. **Breast Cancer Res.**, v.7(1), p.119-29, 2005.
- VIEIRA, S. **Bioestatística – Tópicos avançados** – Rio de Janeiro; Editora Elsevier, 216p., 2004.
- VILLAR E., REDONDO M., RODRIGO I., GARCIA J., AVILA A., MATILLA A. *bcl-2* Expression and apoptosis in primary and metastatic breast carcinomas. **Tumor Biol**, Basel, v.22, p.137-145, 2001.
- VORHERR H. Endocrinology of breast cancer. **Maturitas**, v.9, p.113-122, 1987.
- WAJANT H., GRELL M., SCHEURICH P. TNF receptor associated factors in cytokine signaling. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, Stuttgart, v.10, p.15-26, 1999.
- WANDER R.C., HALL J.A., GRADIN J.L., *et al.* The ratio of dietary (n-6) to (n-3) fatty acids influences immune system function, eicosanoid metabolism, lipid peroxidation and vitamin E status in aged dogs. **Am. Soc. Nutr. Sci.**, v. 127, p. 1198-1205, 1997.

- WEIDNER N., SEMPLE J.P., WELCH W.R., FOLKMAN J. Tumor angiogenesis and metastasis: correlation in invasive breast carcinoma. **N. Engl J. Med**, v.324: 1-8, 1991.
- WEIDNER N. Tumoral vascularity as a prognostic factor in cancer patients: the evidence continues to grow. **Journal of Pathology**, v.184: 119-122, 1998.
- WILSON G.D., CAMPLEJHON R.S., MARTINDALE C.A., BROCK A., LANE D.P., BARNES D.M. Flow cytometric characterisation of proliferating cell nuclear antigen using the monoclonal antibody PC10. **Eur J Cancer**, v.28A (12): 2010-2017, 1992.
- WITHROW S.J., MacEWEN G. Canine mamary tumors. In: _____. **Small animal clinical oncology**. Philadelphia:Saunders, 1996. p.356-72.
- WOLFSHEIMER K.J. Obesity. In: ETTINGER S.J., FELDMAN E.C. **Text book of veterinary internal medicine: diseases of the dog and cat**. 5.ed., Philadelphia: Saunders. 2000. cap. 19, p.70-72.
- YAMAGAMI T, KOBAYASHI T, TAKAHASHI K, SUGIYAMA M. Prognosis for canine malignant mammary tumors based onTNM and histologic classification. **J Vet Med Sci**, v.58 (11): 1079-1083. 1996.
- YANG W-I., EFIRD J.T., QUINTANILLA-MARTINEZ L., NANCY L.H. Cell kinetic study of thymic epithelial tumors using PCNA (PC10) and Ki67 (MIB-1) antibodies. **Human Pathology**, v.27 (1): 70-76, 1996.
- YOO K. et al. Postmenopausal obesity as a breast cancer risk factor according to estrogen and progesterone receptor status (Japan). **Cancer Lett**, v.167, p.57-63, 2001.
- YU CC-W, Filipe M.I. Update on proliferation-associated antibodies applicable to formalin-fixed paraffin-embedded tissue and their clinical applications. **Histochemical Journal**, v.25: 843-853, 1993.
- ZAKHOUR H., WELLS C. The value of fine needle aspiration. In: _____. **Diagnostic cytopathology of the breast**. London: Churchill Livingstone, 1999. p.1-7.
- ZÁRATE ANR. **Factores de Prognóstico en tumores mamários caninos: Fracção de crescimento tumoral (Ki-67 y PCNA), receptores de estradiol,**

- características clínicas e histopatológicas.** Tese de Doutorado; Universidade Complutense de Madrid. RPCV (2002) 97 (543) 119-127, 1996.
- ZEZZA NETO L. Presença de tecido mixomatoso, cartilágneo e ósseo em adenocarcinomas mamários. In: _____. **Tumores mamários malignos na cadela.** Marília: Arte e Ciência, 1997. p. 67-76.
- ZÖRNIG M., HUEBER A.O., BAUM W., EVAN G. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v.1551, p. F1-37, 2001.
- ZUCCARI D.A.P.C., SANTANA, A.E., ROCHA, N.S. Fisiopatologia da neoplasia mamária em cadelas – revisão. **Clín Vet**, n.32, p. 50-4, 2001.
- ZUCCARI D.A.P.C. **Contribuição ao estudo imunoistoquímico dos tumores mamários em cadelas.** Jaboticabal, 1999. 121p. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.

ANEXOS

Anexo 1 - Protocolo

RG:				Data:				Nº:	
Espécie:				Raça:				Sexo:	
								Idade:	
Avaliação Clínica									
Ciclo Estral: 1- Regular				2- Irregular			3- Não apresenta		
Nº de crias: 1- Nenhum		2- Um		3- Dois-Três			4- Mais		
Pseudogestação: 1- Sim				2- Não					
Aborto: 1- Sim				2- Não					
Alterações Uterinas (secreções)/Quando? 1- Sim (Data:							)		2- Não
Já cruzou e não ficou prenha? 1- Sim							2- Não		
Hormônios: 1- Contraceptivos				2- Abortivos			3- Não		
(Tipo:				)		(Data:	)		(Quantas vezes:
Desenvolvimento da lesão: Quando?									
Lesão tumoral prévia: 1- Sim			2- Não		3- Localização		Cirurgia: 1- Sim		2- Não
Tipo de amostra: 1- Biópsia			2- Tumorectomia			3- Mastectomia		4- Outros	
Tamanho:									
Localização: M1		M2	M3	M4	M5				
Consistência: 1- Firme				2- Macia		3- Elástica			
Invasão: 1- Sem aderência				2- Aderido na pele			3-		Aderido em
musculatura									
Mamilo: 1- Sem alteração				2- Ulceração		3- Retração		4-	
Eczema									
Secreção: 1- Sim				2- Não					
Ulceração: 1- Sim				2- Não					
Envolvimento de linfonodos: 1- Axilar					2- Inguinal			3- Sem alteração	
Características do material: 1- Lesão sólida									
2- Lesão Cística					3- Infiltrativa				
Avaliação Histopatológica									
Carcinoma “in situ”: 1- Sim				2- Não					
Envolvimento mioepitelial: 1- Simples					2- Complexo				
Invasivo: 1- Carcinoma papilífero			2- Carcinoma tubular		3- Carcinoma sólido				
4- Carcinoma anaplásico			5- Carcinoma fusiforme		6- Outros:				

Anexo A - Características clínico-antropométricas das cadelas no estágio I portadora de câncer mamário.

Animal	Idade	Porte	Classificação corporal	Peso kg
1	3,10	Pequeno	Ideal	3,2
2	10,4	Médio	Obeso	10,2
3	8	Grande	Ideal	22,9
4	8	Grande	Obeso	29,2
5	7	Médio	Obeso	16
6	11	Médio	Obeso	6,4
7	15	Pequeno	Ideal	2,0
8	11	Grande	Acima do peso	23,0
9	7	Grande	Ideal	30
10	8	Grande	Obeso	40,5

Anexo B - Características reprodutivas das cadelas no estágio I portadora de câncer mamário.

Animal	Crias	Castrada	Cios regulares	Pseudo gestação	Contraceptivo	Secreção vaginal	Aborto
1	+	-	+	+	-	-	-
2	-	-	+	+	-	-	-
3	+	-	+	+	-	-	-
4	+	-	+	+	-	-	-
5	+	-	+	+	-	-	-
6	+	-	+	-	-	-	-
7	+	-	+	-	-	+	-
8	+	-	+	-	-	-	-
9	+	+	+	-	-	-	-
10	-	-	+	+	-	-	-

+*- Positivo

-*- Negativo

Anexo C - Classificação das cadelas no estágio I conforme a distribuição e localização da neoplasia mamária.

Mama direita						Mama esquerda				
Animal	1º	2º	3º	4º	5º	1º	2º	3º	4º	5º
1					+					
2				+						+
3					+			+		+
4			+	+					+	+
5							+	+		
6		+			+	+			+	+
7					+			+		+
8	+	+								
9				+						+
10					+				+	+

+*- Positivo

Anexo D - Diagnóstico histopatológico e grau de malignidade das cadelas no estágio I da doença.

Animal	Carcinoma Simples	Carcinoma complexo	Grau de malignidade
1	-*	+	I
2	+	-	I
3	+	-	I
4	+	-	I
5	+	-	I
6	-	+	I
7	+	-	I
8	-	+	I
9	+	-	I
10	+	-	I

+*- Positivo

-*- Negativo

Anexo E - Características clínico-antropométricas das cadelas no estágio II portadora de câncer mamário.

Animal	Idade	Porte	Classificação corporal	Peso kg
11	13,4	Grande	Obeso	33,2
12	7,1	Grande	Obeso	20,9
13	10,5	Grande	Obeso	21
14	6	Médio	Obeso	10,5
15	8	Pequeno	Obeso	2,8
16	11	Grande	Ideal	20,0
17	10	Médio	Obeso	10,7
18	7	Médio	Acima do peso	13,0
19	8	Médio	Obeso	13
20	11	Grande	Obeso	22

Anexo F - Características reprodutivas das cadelas no estágio II portadora de câncer mamário.

Animal	Crias	Castrada	Cios regulares	Pseudo gestação	Contraceptivo	Secreção vaginal	Aborto
11	+	+	+	-	-	-	-
12	+	+	+	+	+	+	-
13	+	-	+	-	+	-	+
14	+	-	-	-	+	-	-
15	-	-	+	+	-	-	-
16	-	-	+	-	+	-	-
17	+	+	+	-	-	-	-
18	+	-	+	-	-	-	-
19	+	-	+	-	-	+	+
20	-	-	+	-	-	-	-

+*- Positivo

-*- Negativo

Anexo G - Classificação das cadelas no estágio II conforme a distribuição e localização da neoplasia mamária.

Animal	Mama direita					Mama esquerda				
	1º	2º	3º	4º	5º	1º	2º	3º	4º	5º
11			+	+	+			+	+	
12					+					
13										+
14	+			+	+				+	+
15			+			+	+			
16		+	+							
17										+
18								+		
19				+			+			+
20									+	+

+*- Positivo

Anexo H - Diagnóstico histopatológico e grau de malignidade das cadelas no estágio II da doença.

Animal	Carcinoma Simples	Carcinoma complexo	Grau de malignidade
11	+	-	I
12	+	-	I
13	-	+	I
14	-	+	I
15	-	+	I
16	+	-	I
17	+	-	I
18	+	-	II
19	+	-	I
20	+	-	I

+*- Positivo

-*- Negativo

Anexo I - Características clínico-antropométricas das cadelas no estágio III portadora de câncer mamário.

Animal	Idade	Porte	Classificação corporal	Peso Kg
21	13	Médio	Obeso	12,2
22	11	Grande	Acima do peso	18,5
23	11	Grande	Ideal	21,7
24	14	Médio	Acima do peso	12
25	13	Grande	Obeso	31,2
26	10	Médio	Ideal	8,0
27	15	Médio	Obeso	13,0
28	5	Médio	Obeso	10
29	11,6	Médio	Obeso	11,7
30	8	Médio	Acima do peso	7

Anexo J - Características reprodutivas das cadelas no estágio III portadora de câncer mamário.

Animal	Crias		Cios	Pseudo	Contraceptivo	Secreção	Aborto
		Castrada	Regulares	Gestação		vaginal	
21	+	*	+	+	-	+	-
22	+	-	+	-	+	-	+
23	+	-	+	-	-	-	-
24	+	-	+	-	+	-	-
25	+	-	+	-	-	+	+
26	+	-	+	+	-	-	-
27	-	-	+	-	-	-	-
28	-	-	+	+	-	-	-
29	-	+	+	-	-	+	-
30	-	-	+	+	-	-	-

+*- Positivo

*- Negativo

Anexo K - Classificação das cadelas no estágio III conforme a distribuição e localização da neoplasia mamária.

Animal	Mama direita					Mama esquerda				
	1º	2º	3º	4º	5º	1º	2º	3º	4º	5º
21			+		+					+
22			+	+					+	
23				+	+					+
24		+						+		+
25		+	+				+	+	+	+
26			+		+					
27										+
28	+		+	+	+			+		+
29		+	+	+	+			+		+
30			+	+				+	+	

+*- Positivo

Anexo L - Diagnóstico histopatológico e grau de malignidade das cadelas no estágio III da doença.

Animal	Carcinoma Simples	Carcinoma complexo	Grau de malignidade
21	+	-	II
22	+	-	I
23	+	-	I
24	-	+	I
25	+	-	I
26	-	+	I
27	+	-	I
28	+	-	I
29	-	+	I
30	+	-	I

+*- Positivo

-*- Negativo

Anexo M - Características clínico-antropométricas das cadelas no estágio IV portadora de câncer mamário.

Animal	Idade	Porte	Classificação corporal	Peso kg
31	8	Médio	Obeso	9,2
32	8	Pequeno	Ideal	6,2
33	3	Médio	Ideal	7,0
34	9,2	Grande	Ideal	19,0
35	9,11	Grande	Ideal	17,8
36	6	Grande	Ideal	19,0
37	12	Grande	Obeso	26
38	12	Médio	Obeso	9,3
39	7	Médio	Ideal	8,3
40	9	Grande	Obeso	25

Anexo N - Características reprodutivas das cadelas no estágio IV portadora de câncer mamário.

Anima l	Cria s	Castrad a	Cios Regulare s	Pseudo Gestaã o	Contraceptiv o	Secreçã o vaginal	Abort o
31	-*	-	-	-	+	+	-
32	+	-	+	+	-	-	-
33	+	-	+	-	-	-	-
34	+	-	+	-	-	-	-
35	+	-	+	+	-	-	-
36	+	-	+	-	+	-	-
37	+	-	+	+	-	-	-
38	+	-	-	+	-	-	-
39	+	-	+	-	-	-	-
40	+	-	+	-	-	-	-

+*- Positivo

-*- Negativo

Anexo O - Classificação das cadelas no estágio IV conforme a distribuição e localização da neoplasia mamária.

Animal	Mama direita					Mama esquerda				
	1º	2º	3º	4º	5º	1º	2º	3º	4º	5º
31						+	+			
32						+		+		+
33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
34		+						+		+
35						+	+	+	+	+
36	+	+	+	+	+					
37		+	+				+			+
38					+	+	+	+		+
39			+							
40			+	+	+				+	+

+*- Positivo

Anexo P - Diagnóstico histopatológico e grau de malignidade das cadelas no estágio IV da doença.

Animal	Carcinoma Simples	Carcinoma complexo	Grau de malignidade
31	+*	-*	II
32	+	-	II
33	+	-	III
34	+	-	II
35	-	+	II
36	+	-	II
37	-	+	II
38	+	-	II
39	+	-	II
40	+	-	II

+*- Positivo

-*- Negativo