



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Tumores Mamários em Cadelas: Fatores de Prognóstico

Inês Leão Saldanha Rios Peralta

Coimbra, junho 2018



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Tumores Mamários em Cadelas: Fatores de Prognóstico

Coimbra, junho 2018

Inês Leão Saldanha Rios Peralta

Aluna do Mestrado integrado em Medicina Veterinária

Constituição do Júri

Presidente do Júri:

Professora Doutora Inês Crespo

Arguente:

Professora Doutora Ana Catarina Figueira

Orientador:

Professora Doutora Anabela Almeida

Orientador Interno

Professora Doutora Anabela Almeida

Coorientador Interno

Dr. Hugo Vilhena

Orientador (es) Externo (s)

Dra. Carolina Silva

VetPóvoa

Dra. Sofia Moutinho

Consultório Veterinário da Mealhada

Dissertação do Estágio Curricular do Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em Medicina Veterinária da EUVG

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais e irmã o apoio prestado ao longo destes seis anos de curso. A eles o meu bem-haja pela força transmitida e pelos ensinamentos que deram origem à pessoa que sou. Muito obrigada por me acompanharem nesta “luta” tão desejada.

Agradeço aos meus avós por sempre acreditarem nas minhas capacidades e por terem estado sempre presentes nas minhas escolhas.

Um especial agradecimento ao Romeu por me incentivar e por me fazer ver o lado bom de todos os obstáculos.

Agradeço também aos amigos que fazem parte da família e que me acompanharam neste processo de crescimento e enriquecimento pessoal.

Um especial agradecimento à minha Sandrinha, pessoa que me ajudou em tudo o que era necessário e que me acompanhou ao longo do curso. Sandrocas esta amizade é para sempre!!

Um agradecimento à minha orientadora, Professora Doutora Anabela Almeida e ao meu coorientador Professor Dr. Hugo Vilhena por me esclarecerem as dúvidas, por me darem sugestões e por estarem sempre disponíveis para que este trabalho se concretizasse.

Um reconhecimento à Clínica Veterinária Vet Póvoa e Consultório Veterinário da Mealhada nomeadamente ao corpo clínico por terem permitido a realização do estágio curricular nas suas instalações e pela transmissão dos conhecimentos práticos que serão muito importantes no futuro.

Agradeço também a todos os docentes da Escola Universitária Vasco da Gama por terem contribuído para a minha formação profissional.

Deixo também uma saudação às minhas colegas de turma em especial à Isabel, Leonor, Melissa, Bruna e Sofia pelas boleias, pelas horas de estudo, pela animação e constante apoio.

Não poderia deixar de agradecer às minhas fiéis companheiras de quatro patas: Thorcky, Xeny e Romy, por alimentarem este sonho e por todo o amor que dão sem esperar nada em troca.

Só com a ajuda de todos foi possível ter concretizado este sonho de criança. O meu bem-haja.

Índice Geral

Índice de figuras	vi
Índice de tabelas	vii
Lista de abreviaturas.....	viii
Lista de unidades de medida e de símbolos	ix
Resumo.....	2
Abstract	3
Introdução	4
1. Fatores de risco.....	6
2. Fatores de prognóstico	8
2.1. Classificação TNM e Estadio Clínico.....	8
2.2. Classificação Histológica	12
2.3. Grau Histológico de Malignidade de <i>Nottingham</i>	17
2.4. Tratamento	19
2.5. Biomarcadores tecidulares	21
2.6. Biomarcadores séricos	26
Considerações finais	28
Bibliografia.....	30

Índice de Figuras

Figura 1 Grau histológico de <i>Nottingham</i>	19
--	----

Índice de Tabelas

Tabela 1 Estádios da doença em função da classificação TNM.	9
Tabela 2 Prognóstico em função do tratamento e do estádio clínico	10
Tabela 3 Estudos realizados sobre o estádio clínico tumoral.	11
Tabela 4 Classificação histológica 1999.	14
Tabela 5 Classificação histológica dos tumores mamários das cadelas.	16
Tabela 6 Estudos realizados para o grau histológico de carcinomas.	18
Tabela 7 Estudos realizados para marcadores tecidulares e sua relação com o valor de prognóstico	24
Tabela 8 Estudos realizados para marcadores séricos e sua relação com o valor de prognóstico.	27

Lista de abreviaturas

- CA 15-3 – Antígeno Cancerígeno 15-3 (*Cancer Antigen 15-3*)
AgNOR – Regiões Organizadoras Nucleolares Argirófilas (*Argyrophilic Nucleolar Organizer Region*)
CEA – Antígeno Carcino-embrionário (*Carcinoembryonic Antigen*)
AINEs - Anti-Inflamatórios Não Esteróides (*Non-Steroidal Anti-Inflammatory*)
BRCA1 – Gene de Suscetibilidade ao Cancro Mamário 1 (*Breast Cancer 1 Gene*)
COX-2 – Cicloxigenase 2
ER – Recetores de Estrogénio (*Estrogen Receptor*)
GH – Hormona de Crescimento (*Growth Hormone*)
Her-2/neu – Recetor do Fator de Crescimento Epidermal Humano 2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*)
IGF-1 - Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1 (*Insulin-like growth factor 1*)
IL-8 – Interleucina 8
IL-10 – Interleucina 10
LDH – Lactato Desidrogenase (*Lactate Dehydrogenase*)
MUC1 – Mucina 1 (*Mucin 1*)
OVH - Ovariohisterectomia
PCNA – Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*)
% - Percentagem
PR – Recetores de Progesterona (*Progesterone Receptor*)
TK1 – Timidina Quinase (*Thymidine Kinase 1*)
TMC – Tumor mamário canino
TNM - Tumor-Linfonodo-Metástases (*Tumour-Nodes-Metastasis*)
SINE – Elementos Nucleares Intercalados Simples (*Short Intercalated Nuclear Elements*)
TS – Tempo de sobrevida
OMS – Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)

Lista de unidades de medida e de símbolos

cm – Centímetros

m² - Metro Quadrado

mg – Miligramas

mm- Milímetros

Tumores Mamários em Cadelas: Fatores de Prognóstico

Inês Peralta ^a, Hugo Vilhena ^{a,b,c,d}, Anabela Almeida ^{a,b,e}

^a Departamento de Medicina Veterinária, Escola Universitária Vasco da Gama, Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário- Bloco B, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal (ilsrp_239@hotmail.com)

^b Centro de Investigação Vasco da Gama (CIVG), Departamento de Medicina Veterinária, Escola Universitária Vasco da Gama, Av. José R. Sousa Fernandes, 197 Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal

^c Hospital Veterinário do Baixo Vouga, EN1, 355, 3750-742, Águeda, Portugal

^d Centro de Investigação Animal e Veterinária (CECAV), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Quinta de Prados, 5000-801, Vila Real, Portugal

^e Institute for Biomedical Imaging and Translational Research of Coimbra (CIBIT), University of Coimbra, 548-3000 Coimbra, Portugal

Resumo

Os tumores mamários caninos (TMC) são considerados a neoplasia mais frequente em cadelas. Diferentes estudos indicam que cerca de 50% das cadelas com tumores mamários apresentam tumores mamários benignos e 50% manifestem tumores malignos. A evolução clínica dos tumores malignos é muito variável, sendo que o tempo livre de doença e o tempo de sobrevida podem variar entre poucos meses a vários anos.

Os principais fatores de risco associados aos TMC são a idade, a raça, a exposição a hormonas gonadais ou seus análogos, a idade de realização da ovariectomia e a obesidade.

A classificação tumor-linfonodo-metástases (TNM) e o estadió clínico, a classificação histológica, o grau histológico de malignidade de *Nottingham*, o tipo de cirurgia e determinados biomarcadores séricos e tecidulares são atualmente considerados os fatores de prognóstico mais importantes.

Nos últimos anos, os biomarcadores séricos e tecidulares têm sido cada vez mais estudados, uma vez que poderão contribuir de forma decisiva para a abordagem ao TMC. Os marcadores tecidulares mais estudados são os recetores das hormonas sexuais – recetores de estrogénio e de progesterona, o recetor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER-2/neu), o gene de suscetibilidade ao cancro mamário 1 (BRCA1), o p53 e a E-caderina. Os marcadores séricos que poderão ter utilidade ou valor de prognóstico incluem o antígeno cancerígeno 15-3 (CA15-3), a interleucina 8 e 10, a timidina quinase (TK1), a lactato desidrogenase (LDH), a mamoblobina B, a mucina 1 (MUC1) e as sequências CAN SINE (elementos nucleares intercalados simples). Existem também alguns estudos sobre os marcadores de proliferação – regiões organizadoras nucleolares argirófilas (AgNOR), antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e Ki-67. Foram também publicados estudos sobre a enzima COX-2, os inibidores do ciclo dependente da quinase – p16, p21 e p27, o gene TP53, e a glicoproteína antígeno carcino-embrionário (CEA).

Os fatores de prognóstico dos tumores mamários caninos apresentam-se de grande relevância devido à elevada incidência destes tumores e pelas implicações clínicas associadas à sua utilização. Adicionalmente, os tumores mamários da cadela têm também sido usados como modelos biológicos espontâneos dos tumores mamários em humanos.

O presente trabalho pretendeu fazer uma revisão sobre os fatores de prognóstico existentes, tendo em conta a sua utilidade clínica documentada.

Palavras Chave Tumor mamário canino, fatores de risco, fatores de prognóstico, classificação, biomarcadores, marcadores tecidulares, marcadores séricos.

Abstract

Canine mammary tumors (TMC) are considered the most frequent neoplasia in female dogs. Different studies indicate that about 50% of bitches with breast tumors have benign breast tumors, and 50% have malignant tumors. The clinical evolution of malignant tumors varies widely, with disease-free time and survival time ranging from a few months to several years.

The main risk factors associated with CMD are age, breed, exposure to gonad hormones or analogues, age of ovariohysterectomy and obesity.

The tumor-nodes-metastasis (TNM) classification, the clinical stage and histological classification, the histological grade of Nottingham's malignancy, the type of surgery and serum and tissue biomarkers are currently considered the most important prognostic factors. In recent years, serum and tissue biomarkers have been increasingly studied as they may contribute decisively to the approach to TMC. The most studied tissue markers are the sex hormone receptors-estrogen and progesterone receptors; the expression of human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2 / neu); the breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1); p53 and E-cadherin. Serum markers that may have utility or prognostic value are carcinoembryonic antigen (CA15-3), Interleukin 8 and 10, TK1, lactate dehydrogenase (LDH), Mamoblobin B, mucin 1 (MUC1), and CAN SINE (single intercalated nuclear elements) sequences.

There are also some studies on proliferation markers – argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR), proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67; the COX-2 enzyme; the kinase dependent cycle inhibitors - p16, p21 and p27; the TP53 gene; and the carcinoembryonic antigen (CEA) glycoprotein.

This subject is of high relevance due to the high incidence of this type of tumor in dogs, and the clinical implications it may present. In addition, bitch mammary tumors have also been used as spontaneous biological models of mammary tumors in humans. The present study is a review of existing prognostic factors, taking into account the documented utility of these as a prognostic factor, since they have an influence on the treatment of neoplasia.

Key words

Canine breast tumor, risk factors, prognostic factors, classification, biomarkers, tissue markers, serum markers.

Introdução

A incidência de tumores nos canídeos tem vindo a aumentar, sendo que, por ano, estima-se 310 a 958 casos de neoplasias caninas por 100.000 cães (Merlo et al., 2008).

Os tumores mamários são considerados a neoplasia mais frequente em cadelas. Podem ter carácter benigno ou maligno, e os dois tipos de tumor podem estar presentes em simultâneo no mesmo animal (Demetriou, 2010; Tiller, 2015). Diferentes estudos indicam que cerca de 50% das cadelas com tumores mamários apresentam tumores mamários benignos, e 50% manifestem tumores malignos (Case et al., 2017; Damasceno et al., 2012; Araújo, Campos, Ferreira, & Cassali, 2015; Demetriou, 2010; Fossum, 2002; Gundim, de Araújo, Blanca, Guimarães, & Medeiros, 2016; Harting et al., 2017; Kwon et al., 2017; Tiller, 2015; Santos et al., 2013; Soler et al., 2016; Trere, Flagstad, Jensen, & Hellme, 2008). Este tumor representa cerca de 50-70% de todos os tumores em cadelas (Damasceno et al., 2012; Araújo, Campos, Ferreira, & Cassali, 2015; Moe., 2001; Tiller, 2015; Lascelles, 2014), sendo raros em machos, que apresentam 62 vezes menor predisposição para desenvolver a doença. Nos machos são geralmente benignos (Choi et al., 2016; Demetriou, 2010; Grüntzig et al., 2016; Gundim et al., 2016; Kwon et al., 2017; Lascelles, 2014).

Apesar da patogenia não estar completamente esclarecida, esta doença aparenta estar associada a fatores hormonais. Contudo, existem outros fatores de risco que aumentam a predisposição, tais como a idade; a raça (sendo mais comum em animais de raça pequena) e a obesidade (Choi et al., 2016; Demetriou, 2010; Kim et al., 2016; Kwon et al., 2017; Tiller, 2015; Philibert et al., 2003).

Os tutores devem ser alertados para as complicações e gravidade da doença em causa. Assim, os Médicos Veterinários devem propor aos tutores a realização de ovariectomia (OVH) antes do primeiro estro da fêmea uma vez que irá reduzir para 0,5% a probabilidade de surgir a doença (Tiller, 2015).

A classificação Tumor-Linfonodo-Metástases (TNM), a classificação histológica e a determinação do grau histológico de *Nottingham* apresentam-se como os fatores de prognóstico mais consensuais na maioria dos estudos (Fossum, 2002; Gundim et al., 2016; Tiller, 2015; Santos et al., 2015).

Nos últimos anos, os biomarcadores séricos e tecidulares têm sido cada vez mais utilizados, uma vez que adicionam informações importantes em relação ao prognóstico e tratamento. Exemplo destes marcadores são o recetor do fator de crescimento epidermal humano 2 (HER-2/neu), o gene de suscetibilidade ao cancro mamário 1 (BRCA1), a p53, a E-caderina, os recetores de estrogénio (RE) e de progesterona (RP), as regiões organizadoras nucleolares argirófilas (AgNOR), o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), o antígeno cancerígeno 15-3 (CA 15-3), o antígeno carcino-embrionário (CEA), as interleucinas 8 e 10 (IL-8 e IL-10), entre outros (Kabir et al., 2017; Santos et al., 2013).

O tratamento deve ser adequado à evolução da doença, considerando o seu prognóstico. O tratamento mais comumente realizado é a excisão cirúrgica da(s) massa(s) mamárias. Em alguns

casos a quimioterapia poderá estar indicada, geralmente em associação com o tratamento cirúrgico, em animais com risco de metástases ou recidiva do tumor (Araújo et al., 2015; Fossum, 2002; Horta et al., 2015; Kwon et al., 2017; Tiller, 2015; Lascelles, 2014).

Os tumores mamários da cadela são também importantes modelos biológicos para o estudo dos tumores mamários em humanos (Kabir et al., 2017).

Os fatores de prognóstico dos tumores mamários caninos apresentam-se como um tema de elevada relevância clínica, devido à incidência elevada deste tipo de tumor e pelas implicações clínicas associadas à sua utilização.

1. Fatores de Risco

Os fatores de risco têm um papel fundamental no desenvolvimento dos tumores mamários, pelo que vários são os estudos realizados com o propósito de identificar e determinar estes fatores. Os principais são a idade, a raça, a exposição a hormonas gonadais ou análogos, a idade de realização de OVH e a obesidade (Antunes, 2014; Baioni et al., 2017; Choi et al., 2016; Demetriou, 2010; Kwon et al., 2017; Tiller, 2015; Mafalda & Oliveira, 2009; Philibert et al., 2003).

Aproximadamente 70% dos animais afetados apresentam múltiplos tumores, sendo que 65% a 75% dos tumores ocorrem nas glândulas mamárias abdominal caudal e inguinal (M4 e M5 respetivamente), que são as glândulas que apresentam maior volume de tecido mamário (Cassali et al., 2011; Demetriou, 2010; Fossum, 2002; Tiller, 2015; Nguyen et al., 2017; Salas, Márquez, Diaz, & Romero, 2015; Withrow & MacEven, 2013). Os animais com tumores mamários benignos apresentam um risco três vezes maior de desenvolver tumores malignos (Fossum, 2002; Lascelles & Dobson 2003).

Os tumores mamários caninos são mais frequentes em animais geriátricos, com um pico entre os nove e os onze anos, sendo que raramente surgem em animais com menos de cinco anos. O primeiro grupo apresenta malignidade, já em cadelas dos sete aos nove anos geralmente é benigno (Choi et al., 2016; Damasceno et al., 2012; Demetriou, 2010; Egenvall et al., 2005; Fossum, 2002; Gundim et al., 2016; Hyun- Woo Kim, Jung-Hyung Ju, Jong-II Shin, Byung-Joon Seung, 2017; Kwon et al., 2017; Tiller, 2015; Malatesta, 2015; Perez Alenza, Peña, del Castillo, & Nieto, 2000; Withrow & MacEven, 2013).

Diversos estudos reportam uma predisposição racial no TMC (Choi et al., 2016; Gundim et al., 2016; Moulton, 1990; Kwon et al., 2017; Tiller, 2015). As raças mais suscetíveis ao desenvolvimento de tumores mamários parecem ser as de pequeno e médio porte, designadamente em Maltês, Shih Tzu, Yorkshire Terrier, Caniche Miniatura, Dachshund, Fox Terrier, Cocker Spaniel, Spaniel Bretão, Springer Spaniel Inglês, Beagle; mas também outras de grande porte tais como, Labrador Retriever, Setter Inglês, Pointer Inglês e Dobermann (Baioni et al., 2017; Choi et al., 2016; Damasceno et al., 2012; Fossum, 2002; Grüntzig et al., 2016; Jeffrey C. Philibert, Paul W. Snyder, Nita Glickman, Larry T. Glickman, Deborah W. Knapp & Waters, 2003; Johnston, 1998; Kim et al., 2016; Tiller, 2015; Lascelles, 2014; Salas et al., 2015; Tavasoly, Golshahi, Rezaie, & Farhadi, 2013). As cadelas de porte pequeno apresentam risco de desenvolver tumor mamário três vezes maior do que animais de grande porte (Grüntzig et al., 2016). As fêmeas da raça Pastor Alemão apresentam um elevado risco de desenvolvimento de neoplasias mamárias malignas (Lascelles, D. & Dobson, J. 2003; Lascelles, 2014; Salas et al., 2015; Tavasoly et al., 2013; Withrow & MacEven, 2013). Os animais da raça Boxer são considerados como menos predispostos, sendo que, quando surge, é em cães jovens (Johnston, 1998; Withrow & MacEven, 2013).

Os TMC parecem estar relacionados com a exposição a hormonas sexuais (Demetriou, 2010; Moulton, 1990; Kristiansen et al., 2016; Kwon et al., 2017; Tiller, 2015; Lascelles, 2014). O estrogénio é uma dessas hormonas, que pode exercer efeito genotóxico no epitélio da glândula mamária e,

assim, dar origem à neoplasia (Tiller, 2015). A progesterona aumenta a concentração e expressão da hormona de crescimento (GH), tal como dos seus recetores pela glândula mamária, aumentando assim as concentrações do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1 (IGF-1), que, conseqüentemente, induz a proliferação celular, que pode dar origem à neoplasia (Demetriou, 2010; Tiller, 2015; Lascelles, D. & Dobson, J. 2003; Lascelles, 2014). Os animais expostos a tratamentos com hormonas exógenas em doses superiores às fisiológicas, como é exemplo a progestina e o estrogénio, poderão apresentar maior risco de desenvolver tumores malignos da glândula mamária (Moulton, 1990; Kwon et al., 2017; Lascelles, D. & Dobson, J. 2003; Withrow & MacEven, 2013). Alguns autores referem que a administração destas hormonas como tratamento contraceptivo eleva a síntese da hormona de crescimento, originando tumores mamários benignos (Fossum, 2002; Perez Alenza et al., 2000; Withrow & MacEven, 2013). Contudo, apenas 50-77% de tumores mamários expressam recetores hormonais, o que poderá significar que nem todos os tumores das glândulas mamárias se apresentam relacionados com causas hormonais (Fossum, 2002; Hyun- Woo Kim, Jung-Hyung Ju, Jong-Il Shin, Byung-Joon Seung, 2017; Kwon et al., 2017).

A OVH parece ser o método mais eficaz de prevenção deste tipo de neoplasia maligna (Arenas, Peña, Granados-Soler, & Pérez-Alenza, 2016; Choi et al., 2016; Grüntzig et al., 2016; Hyun- Woo Kim, Jung-Hyung Ju, Jong-Il Shin, Byung-Joon Seung, 2017; Lascelles, D. & Dobson, J. 2003; Nguyen et al., 2017; Withrow & MacEven, 2013). A realização de OVH antes do primeiro estro está atualmente recomendada devido a reduzir o risco de desenvolvimento de tumores mamários para valores de 0,5%. Caso a cirurgia seja realizada entre o primeiro e o segundo ciclo éstrico, esse risco aumenta para 8%, e após o segundo estro há 26% de risco de tumor. Esta cirurgia não apresentará efeitos na redução de risco de desenvolvimento de tumores malignos, se realizada após os dois anos e meio de vida do animal, podendo no entanto ter efeito na redução do aparecimento de tumores benignos (Demetriou, 2010; Fossum, 2002; Gundim et al., 2016; Kwon et al., 2017; Tiller, 2015; Lascelles, 2014; Philibert et al., 2003; Salas et al., 2015; Withrow & MacEven, 2013). A incidência de tumores mamários é de 2,5% a 25% em cadelas não submetidas a esterilização (Lascelles, D. & Dobson, J. 2003). Estudos realizados no Reino Unido revelaram uma incidência de 205 casos por 100.000 canídeos. Na Suécia a incidência de tumores mamários é de 111 cães por 10.000 indivíduos, sendo que neste país a prática de OVH é menos comum que no Reino Unido (Demetriou, 2010; Dobson JM, Samuel S, Milstein H, Rogers K, 2002; Egenvall et al., 2005).

A obesidade é também considerada um fator de risco no desenvolvimento dos tumores mamários devido à influência do tecido adiposo e de elevadas concentrações de colesterol na secreção hormonal. Os animais com condição corporal elevada apresentam um prognóstico mais desfavorável (Tiller, 2015; Lascelles, D. & Dobson, J. 2003; Lim, Im, Kim, Kim, Shin, & Sur, 2015; Lim, Im, Kim, Kim, Shin, Yhee, et al., 2015; Philibert et al., 2003; Withrow & MacEven, 2013). Estudos de prevalência de tumores mamários identificaram alguns fatores de risco relacionados com a obesidade e alimentação, designadamente, 1) obesidade no primeiro ano de vida; 2) obesidade detetada um ano antes do diagnóstico da doença; 3) alimentação sem preparados comerciais, com predomínio de carne bovina e suína em detrimento de carne de frango (Demetriou, 2010; Jeffrey C. Philibert, Paul

W. Snyder, Nita Glickman, Larry T. Glickman, Deborah W. Knapp & Waters, 2003; Lascelles, D. & Dobson, J. 2003; Lascelles, 2014; Lim, Im, Kim, Kim, Shin, Yhee, et al., 2015; Pérez-Alenza, Rutteman, Peña, & Cuesta, 1998; Withrow & MacEven, 2013). As cadelas magras ou com condição corporal ideal aos doze meses de idade apresentam menor risco de tumor mamário e maiores tempos de sobrevivência (TS) do que animais obesos, identificados antes do diagnóstico da doença (Philibert, Snyder, Glickman, Glickman, Knapp & Waters, 2003; Lim, Im, Kim, Kim, Shin, Yhee, et al., 2015; Withrow & MacEven, 2013). Alguns estudos demonstram que os tumores mamários em animais obesos ou com peso acima do ideal estão maioritariamente inseridos no grau histológico III, sugerindo que a condição corporal possa estar relacionada com a progressão da doença e associado a um pior prognóstico (Lim, Im, Kim, Kim, Shin, & Sur, 2015; Lim, Im, Kim, Kim, Shin, Yhee, et al., 2015). Apesar de ainda não estar completamente compreendida a relação entre a obesidade e a carcinogênese, os animais obesos apresentam uma menor ligação entre as hormonas sexuais circulantes e as globulinas, levando ao aumento de concentrações de estrogénio livre e de outras hormonas como a IGF-1, que estimulam a proliferação do epitélio mamário, bem como de células com mutações (Philibert et al., 2003; Tiller, 2015; Lim et al., 2015; Withrow & MacEven, 2013).

A obesidade causa resistência à insulina sendo comum nestes animais a hiperinsulinémia e, conseqüentemente, o aumento de IGF-1, podendo originar taxas de mortalidade mais elevadas devido ao crescimento do tumor (Lim et al., 2015). A obesidade poderá também contribuir para o aumento da síntese, deposição e libertação de produtos carcinogénicos, originando um aumento da carcinogênese em todos os tecidos corporais (Lim et al., 2015; Philibert et al., 2003).

2. Fatores de prognóstico

A classificação TNM, o grau histológico de *Nottingham*, a classificação histológica bem como o tipo de cirurgia apresentam-se atualmente como relevantes fatores de prognóstico (Antunes, 2014; Fossum, 2002; Gundim et al., 2016; Tiller, 2015; Santos et al., 2013; Santos et al., 2015). Nos últimos anos, os biomarcadores tecidulares e séricos têm vindo a ganhar importância como potenciais fatores de prognóstico (Fossum, 2002; Gundim et al., 2016; Tiller, 2015; Santos et al., 2013; Santos et al., 2015).

2.1. Classificação TNM e Estadio Clínico

A avaliação do tumor de acordo com a sua extensão e estadio é fundamental para que seja possível determinar o prognóstico da doença. Tal é possível recorrendo ao sistema TNM preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), conforme Tabela 1, que se aplica apenas a carcinomas. Este sistema avalia a 1) dimensão da(s) massa(s) do tumor, 2) o grau de afeção dos linfonodos regionais, 3) existência de metástases à distância, estando relacionado com o estadio clínico da doença (Cassali et al., 2011; Damasceno et al., 2012; Demetriou, 2010; Gundim et al., 2016; Tiller, 2015; Lascelles, 2014; Withrow, S., & Vail, 2007; Withrow & MacEven, 2013).

Os tumores mamários podem ser classificados em cinco estadios diferentes que se encontram descritos nas Tabelas 1 e 2.

Diferentes estudos demonstraram que existir uma correlação entre o tamanho do tumor e a sua malignidade, bem como a presença de metástases nos linfonodos regionais e à distância, determinando assim o tempo de sobrevida esperado para o animal em causa (Anadol et al., 2017; Carvalho, Pires, Prada, Lobo, & Queiroga, 2016; Case et al., 2017; Cassali et al., 2011; Fossum, 2002; Gundim et al., 2016; Lascelles, 2014; Withrow & MacEven, 2013).

Um tumor primário que apresente menos de três cm de diâmetro tem um prognóstico mais favorável do que os que apresentam diâmetro superior a três cm. Sendo que a diferença entre o estadio I, II e III é o respetivo tamanho, conforme Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 Estadios da doença em função da classificação TNM.

Estadio	Classificação TNM
I	T1N0M0
II	T2N0M0
III	T3N0M0
IV	T1,2,3 N1M0
V	T1,2,3 N0,1M1

T– Tamanho de Tumor Primário; T1 - Tumor com menos de três centímetros (cm) de diâmetro; T2- Tumor entre três a cinco cm de diâmetro; T3- Tumor com mais do que cinco cm de diâmetro; N - Metástases nos Linfonodos Regionais; N0- Ausência de metástases nos linfonodos por citologia ou por histologia; N1- Metástases detetadas por citologia ou por histologia; M - Metástases à distância; M0 - Ausência de deteção de metástases à distância; M1- Deteção de metástases à distância. Adaptado de: (Cassali et al., 2011; de Araújo et al., 2015; Demetriou, 2010; Larry P. Tiller, 2015; Lascelles, 2014; Withrow & MacEven, 2013).

Tabela 2 Prognóstico em função do tratamento e do estadio clínico (Adaptado de: Cassali et al., 2011; Larry P. Tiller, 2015).

ESTADIO	TRATAMENTO	PROGNÓSTICO
I	Excisão completa	Bom prognóstico
II	Excisão completa	Bom prognóstico
III	Apenas com excisão	Tempo médio de sobrevida de 10 meses
IV	Com excisão	Tempo médio de sobrevida de 5 a 10 meses
V	_____	Tempo médio de sobrevida inferior a 6 meses

Tal como em medicina humana, o grau de afeção dos linfonodos regionais é importante, uma vez que tem impacto direto na sobrevida de indivíduos com tumor mamário maligno (Cassali et al., 2011; Damasceno et al., 2012; Demetriou, 2010; Gundim et al., 2016; Tiller, 2015; Lascelles, 2014; Withrow, S., & Vail, 2007; Withrow & MacEven, 2013).

De modo a detetar as metástases nos linfonodos deve realizar-se o exame físico completo, com avaliação do tamanho, forma, textura e mobilidade dos linfonodos. O aumento do tamanho do mesmo, formas irregulares, textura mais consistente e aderências a tecidos são potencialmente compatíveis com neoplasia (Cassali et al., 2011; Lascelles, 2014; Soler et al., 2016).

Os animais com presença de metástases nos linfonodos regionais apresentam menores TS do que indivíduos sem metástases (Cassali et al., 2011; Araújo et al., 2015; Demetriou, 2010; Rasotto, Zappulli, Castagnaro, & Goldschmidt, 2012). A deteção de metástases nos linfonodos que drenam a região afetada está associada a taxas de recorrência até 80% nos seis meses a partir do diagnóstico e a elevada mortalidade (86%) em dois anos (Demetriou, 2010).

Quando o diâmetro da metástase do linfonodo é superior a 7,32 milímetros (mm) - macrometástase, os TS apresentam valores mais baixos do que em animais com micrometástases, de 0,2mm a 2 mm (Araújo et al., 2015). Os animais que tenham mais do que um linfonodo com metástases apresentam pior prognóstico (Araújo et al., 2015).

Podem ainda ser identificados casos de neoplasia sem afeção dos linfonodos regionais, mas com metastização à distância - estadio V (Cassali et al., 2011; Araújo et al., 2015; Demetriou, 2010; Tiller, 2015; Lascelles, 2014; Withrow & MacEven, 2013). Neste estadio, os TS do indivíduo são inferiores e o prognóstico é reservado (Demetriou, 2010). Comparativamente, o estadio I está relacionado com ausência de metástases nos linfonodos regionais e à distância e, o que conduz a um prognóstico mais favorável (Demetriou, 2010).

Os tumores em estadios iniciais (I, II e III) têm uma taxa de recidiva de cerca de 19-24% nos dois anos pós excisão da massa, enquanto que os estadios mais avançados a taxa de recidiva aumenta para 90-97% no mesmo período de tempo (Demetriou, 2010).

Os estudos bibliográficos sobre o estadio clínico tumoral (Tabela 3) comprovam que quanto maior for a dimensão de um tumor, menor será a esperança da vida do indivíduo, havendo também um prognóstico menos favorável. Estes estudos também constataam que estadios menores (por exemplo estadio I) estão relacionados com ausência de metástases à distância e nos linfonodos regionais, o que conduz a um prognóstico mais favorável. Contudo, esta classificação não refere informações sobre a localização dos linfonodos com metástases e o tamanho da metástase (Araújo et al., 2015).

Tabela 3 Estudos realizados sobre o estadio clínico tumoral.

Autor	N	Estadio Clínico	Conclusão
(Muhammadnejad, Keyhani, Mortazavi, Behjati, & Haghdoost, 2012)	35	51,4% em Estadio II.	Mais de 90% dos tumores com mais de cinco cm. Estadio clínico mais comum: II.
(Carvalho et al., 2016)	64	Sem dados	Tumores com maiores dimensões estão associados a tempo de sobrevida menor.
(Santos et al., 2013)	85	Estadio I	Tumores >3 cm apresentaram tempo de sobrevida reduzido.
(Santos et al., 2015)	59	Sem dados	Tumores com menores dimensões, T1, têm tempo de sobrevida significativamente maior que neoplasias de maiores dimensões. TII e TIII sem diferenças significativas no que diz respeito ao tempo de sobrevida livre de doença.
(Gundim et al., 2016)	63	→ Estadio I: 31,75% → Estadio II: 19,05% → Estadio III: 19,05% → Estadio IV: 22,22% → Estadio V: 7,93%	Estadio I sem metástases nos linfonodos regionais e à distância, têm melhor prognóstico que os restantes.
(Ferreira, Bertagnolli, Cavalcanti, Schmitt, & Cassali, 2009)	38	→ Estadio I → Estadio II → Estadio III → Estadio IV:0% → Estadio V:0%	Correlação negativa significativa entre o tamanho do tumor e o tempo de sobrevida global. Animais em estadio I apresentaram tempo de sobrevida global significativamente superior a TII e TIII.

2.2. Classificação Histológica

Sabe-se que 50% dos tumores se apresentam como malignos e 50% destes apresentam-se metastizados no momento do diagnóstico (Case et al., 2017; Damasceno et al., 2012; Araújo et al., 2015; Demetriou, 2010; Fossum, 2002; Gundim et al., 2016; Harting et al., 2017; Kwon et al., 2017; Tiller, 2015; Santos et al., 2013; Soler et al., 2016; Trere et al., 2008); e que, segundo Tiller (2015) “58 a 70% das cadelas afetadas irão desenvolver outro tumor na cadeia mamária ipsilateral”.

Segundo a OMS em 1999 (Tabela 4) os tumores malignos são categorizados com base no tipo celular neoplásico – epitelial e/ou mioepitelial e/ou conjuntivo, de acordo com a sua morfologia, sendo este também um fator de prognóstico que pode influenciar a terapêutica (Demetriou, 2010; Goldschmidt, Peña, Rasotto, & Zappulli, 2011; Gundim et al., 2016; Im et al., 2014; Lascelles, 2014). Em 2011 foi proposta uma nova classificação por Goldschmidt et al. (Tabela 5). Os tumores mamários benignos e os designados como inclassificados apresentam, por norma, um bom prognóstico, Tabela 4 (Lascelles, 2014). Os tumores benignos normalmente têm pequenas dimensões e são bem circunscritos (Demetriou, 2010). Os tumores benignos mais comumente encontrados são os adenomas complexos, tumores benignos mistos e adenomas simples (Im et al., 2014).

Em relação aos tumores malignos, estes sistemas de classificação consideram o processo de diferenciação das células tumorais, ou seja, os tumores malignos que preservam semelhanças com a estrutura normal da glândula mamária, apresentam-se primeiro, e depois, surgem os tumores com pouca diferenciação, não apresentando estrutura glandular. O grau de diferenciação relaciona-se com o prognóstico. Assim, tumores malignos bem diferenciados apresentam melhor prognóstico, e quando sujeitos a remoção cirúrgica completa por norma não metastizam (Lascelles, 2014).

O tipo de tumor mais frequentemente diagnosticado é o de origem epitelial, sendo que, de acordo com alguns estudos mais de 90% de todos os tumores de mama malignos apresentam uma componente epitelial (Demetriou, 2010; Diessler, Castellano, Portiansky, Burns, & Idiart, 2017; Fossum, 2002; Kim et al., 2016; Philibert et al., 2003; Rasotto et al., 2012; Withrow & MacEven, 2013). Os restantes são sarcomas e carcinosarcomas (Demetriou, 2010; Fossum, 2002; Lascelles, D. & Dobson, J. 2003; Philibert et al., 2003; Withrow & MacEven, 2013). Os tipos de carcinoma mais comuns são os complexos e dos carcinomas simples, os tubulopapilares e os sólidos (Malatesta, 2015). Os carcinomas anaplásticos são pouco comuns, correspondendo a aproximadamente 7,6% dos tumores malignos (Cassali et al., 2011).

Os carcinomas simples apresentam-se com pior prognóstico do que os carcinomas complexos, (Gundim et al., 2016). Os carcinomas simples possuem elevada capacidade de invasão e de disseminação pelo organismo, sendo por isso, um tipo de tumor com prognóstico pouco favorável (Lascelles, 2014).

Dos carcinomas simples, os anaplásticos são os que possuem maior grau de agressividade, seguindo-se os sólidos e, por fim, os tubulopapilares (Fossum, 2002; Gundim et al., 2016; Kitchell, 2003; Lascelles, 2014).

Os carcinomas inflamatórios possuem um mau prognóstico, com um tempo medio de sobrevida inferior a três meses. Caracterizam-se por serem pouco delimitados e com aspeto difuso podendo abranger as duas cadeias mamárias, doloroso, de crescimento rápido, quente e que origina edema, inflamação cutânea, eritema e apresenta uma elevada capacidade de metastização (Cassali et al., 2011; Demetriou, 2010; Fossum, 2002; Tiller, 2015; Lascelles, D. & Dobson, J. 2003; Lascelles, 2014; Marconato et al., 2009; Withrow & MacEven, 2013). O edema deve-se à capacidade deste tipo de tumor obstruir o sistema linfático, provocando acumulação da linfa em redor do tumor e nos membros (Fossum, 2002; Lascelles, D. & Dobson, J. 2003; Withrow & MacEven, 2013). Representa 4% a 18% das neoplasias mamárias (Hahn & Richardson, 1992; Mafalda & Oliveira, 2009).

Os carcinoma de células escamosas apresentam também mau prognóstico, com desenvolvimento precoce metástases nos linfonodos regionais (Lascelles, 2014).

A maioria dos sarcomas mamários são osteossarcomas ou fibrossarcomas (Lascelles, 2014). A maioria dos animais com sarcoma mamário apresenta um TS inferior a 12 meses após diagnóstico, sendo que estão associados a uma maior incidência de metástases e um pior prognóstico do que os carcinomas (Demetriou, 2010; Fossum, 2002; Tiller, 2015).

Os carcinossarcomas apresentam-se com um prognóstico semelhante ao carcinoma anaplástico, tendo um comportamento agressivo (Carvalho et al., 2016; Lascelles, 2014; Santos et al., 2013).

Tabela 4 Classificação Histológica da Organização Mundial de Saúde, 1999. Adaptado de: (Cassali et al., 2011; Fossum, 2002; Goldschmidt et al., 2011; Lascelles, 2014).

Malignos	
→	Carcinomas não Infiltrativos (<i>in situ</i>)
→	Carcinoma Complexo
→	Carcinoma Simples:
○	Carcinoma Tubulopapilar
○	Carcinoma Sólido
○	Carcinoma Anaplásico
→	Tipos Especiais de Carcinoma:
○	Carcinoma de Células de fuso
○	Carcinoma de Células Escamosas
○	Carcinoma Mucinoso
○	Carcinoma Rico em Lípidos
→	Sarcomas
○	Fibrossarcoma
○	Osteossarcoma
○	Outros Sarcomas
→	Carcinossarcoma
→	Carcinoma ou Sarcoma em Tumor Benigno
Benignos	
→	Adenoma
○	Adenoma Simples
○	Adenoma Complexo
○	Adenoma Basaloide
→	Fibroadenoma
→	Tumor Misto Benigno
→	Papiloma Ductal
Tumores Inclassificados	
Hiperplasia e Displasia Mamária	
→	Hiperplasia Ductal
→	Hiperplasia Lobular
→	Quisto
→	Ductectasia
→	Fibrose Local
→	Ginecomastia

A classificação histológica de 2011 (Tabela 5) é uma proposta de modificação da classificação anterior, que inclui novos subtipos histológicos (Goldschmidt et al., 2011).

De acordo com esta classificação, as neoplasias malignas mais comuns são os carcinomas mistos e os complexos, seguidos dos simples (Damasceno et al., 2012; Goldschmidt et al., 2011; Gundim et al., 2016; Hyun-Woo Kim, Ha-Young Lim, Jong-Il Shin, Byung-Joon Seung, Jung-Hyung Ju, 2016; Im et al., 2014; Rasotto, Berlatto, Goldschmidt, & Zappulli, 2017; Tavasoly et al., 2013). Os carcinomas mistos e complexos são mais frequentes em animais jovens. Tumores com pior prognóstico predominam em animais mais idosos (Damasceno et al., 2012; Hyun-Woo Kim, Ha-Young Lim, Jong-Il Shin, Byung-Joon Seung, Jung-Hyung Ju, 2016; Tavasoly et al., 2013).

Os carcinomas complexos apresentam-se com melhor prognóstico do que os carcinomas simples (Asproni, Ressel, Millanta, Vannozzi, & Poli, 2015; Araújo et al., 2015; Kitchel, S. 2003; Rasotto et al., 2012; Sánchez-Céspedes et al., 2016; Santos et al., 2015; Tavasoly et al., 2013). O carcinoma simples sólido apresenta maior malignidade do que o tubulopapilar, o misto, o papilar e o tubular (Araújo et al., 2015; Kitchell, 2003; Kim et al., 2016; Rasotto et al., 2012; Tavasoly et al., 2013). O carcinoma cribriforme é pouco comum, contudo, apresenta pior prognóstico que o carcinoma tubulopapilar e sólido (Tavasoly et al., 2013). O carcinosarcoma (tumor mamário maligno misto) é raro, de rápido crescimento e agressivo (Morais, Affonso, Bitencourt, 2017; Rasotto et al., 2017; Tavasoly et al., 2013).

Os carcinomas mistos apresentam-se como os menos agressivos e com melhor prognóstico, sendo dos mais frequentes (Gundim et al., 2016; Im et al., 2014; Peña, Andrés, Clemente, Cuesta, & Pérez-Alenza, 2013; Sánchez-Céspedes et al., 2016; Santos et al., 2015).

Tabela 5 Classificação Histológica dos Tumores Mamários das Cadelas, proposta por Goldschmidt et al., (2011).

Neoplasias Epiteliais Malignas	
→	Carcinoma <i>in situ</i>
→	Carcinoma Simples
	○ Tubular
	○ Tubulopapilar
	○ Papilar
	○ Cribriforme
→	Carcinoma Micropapilar Invasivo
→	Carcinoma Sólido
→	Comedocarcinoma
→	Carcinoma Anaplástico
→	Carcinoma com Origem em Adenoma Complexo/Tumor Misto
→	Carcinoma Complexo
→	Carcinoma e Mioepitelioma Maligno
→	Carcinoma Misto
→	Carcinoma Ductal
→	Carcinoma Papilar Intraductal
Neoplasias Epiteliais Malignas – Tipos Especiais	
→	Carcinoma das Células Escamosas
→	Carcinoma Adenoscamoso
→	Carcinoma Mucinoso
→	Carcinoma Rico em Lípidos
→	Carcinoma das Células de Fuso
	○ Mioepitelioma Maligno
	○ Carcinoma das Células Escamosas – Variante de Células de Fuso
	○ Carcinoma – Variante de Células de Fuso
→	Carcinoma Inflamatório
Neoplasias Mesenquimatosas Malignas - Sarcomas	
→	Osteossarcoma
→	Condrossarcoma
→	Fibrossarcoma
→	Hemangiossarcoma
→	Outros Sarcomas
Carcinossarcoma – Tumor Mamário Misto Maligno	
Neoplasias Benignas	
→	Adenoma Simples
→	Adenoma Papilar Intraductal
→	Adenoma Ductal
→	Fibroadenoma
→	Mioepitelioma
→	Adenoma Complexo
→	Tumor Benigno Misto
Hiperplasia/Displasia	
→	Ectasia Ductal
→	Hiperplasia Lobular
	○ Regular
	○ Com Atividade Secretora
	○ Com Fibrose
	○ Com Atipia
→	Epiteliose
→	Papilomatose
→	Mudança Fibroadenomatosa
→	Ginecomastia
Neoplasias do Mamilo	
→	Adenoma
→	Carcinoma
→	Carcinoma com Infiltração Epidérmica
Hiperplasia/Displasia do Mamilo	
→	Melanose da Pele do Mamilo

2.3. Grau Histológico de Malignidade de *Nottingham*

A avaliação do grau histológico de malignidade dos carcinomas apresenta-se como um fator de prognóstico importante, uma vez que agrupa os tumores de acordo com o seu comportamento biológico, tendo como base a avaliação da arquitetura e variações morfológicas do tumor (Elston, 1991; Misdrop, Else, Hellmén, & Lipscomb, 1999; Santos et al., 2015; Santos et al., 2015; Tavasoly et al., 2013). Este tipo de avaliação é válida apenas para tumores epiteliais (Tiller, 2015; Santos et al., 2015).

Esta classificação compreende três graus (I, II e III), sendo que o primeiro grau se refere a massas bem diferenciadas, o segundo a massas moderadamente diferenciadas e o grau III diz respeito a massas pouco diferenciadas (Anadol et al., 2017; Antunes, 2014; Damasceno et al., 2012; Hyun-Woo Kim, Ha-Young Lim, Jong-Il Shin, Byung-Joon Seung, Jung-Hyung Ju, 2016; Tiller, 2015; Lim, Im, Kim, Kim, Shin, Yhee, et al., 2015; Meuten, 2002; Santos et al., 2015; Tavasoly et al., 2013). A mesma tem como base a formação tubular, o pleomorfismo nuclear e o número de mitoses (Anadol et al., 2017; Antunes, 2014; Case et al., 2017; Cassali et al., 2011; Damasceno et al., 2012; Hyun-Woo Kim, Ha-Young Lim, Jong-Il Shin, Byung-Joon Seung, Jung-Hyung Ju, 2016; Tiller, 2015; Lim, Im, Kim, Kim, Shin, Yhee, et al., 2015; Meuten, 2002; Santos et al., 2015; Santos et al., 2015, 2014; Tavasoly et al., 2013).

A categorização é efetuada atribuindo os valores (1, 2 ou 3) com base nas características microscópicas. Assim, na formação tubular, é atribuído um ponto se tiver formação tubular bem marcada; dois pontos se a formação tubular for moderada e três pontos se não existirem túbulos, ou em baixo número. No que diz respeito à hipercromia e às mitoses é atribuído um ponto se se observar casualmente uma figura hipercromática ou mitótica, num campo de grande ampliação; dois pontos se se encontrarem algumas figuras ou três pontos se existirem em maior número. Por fim, quanto ao pleomorfismo nuclear, um ponto se existir leve aumento na variabilidade do tamanho dos núcleos, forma e coloração; dois pontos se existir mudança moderada de tamanho e forma nuclear e três pontos se estiver presente pleomorfismo evidente (Anadol et al., 2017; Cassali et al., 2011; Goldschmidt et al., 2011; Meuten, 2002; Santos et al., 2015; Santos et al., 2015; Tavasoly et al., 2013). Após realização da pontuação de cada parâmetro é necessário realizar um somatório dos valores atribuídos de modo a que se possa associar o grau de malignidade, como se pode observar na Figura 1 (Cassali et al., 2011; Hyun-Woo Kim, Ha-Young Lim, Jong-Il Shin, Byung-Joon Seung, Jung-Hyung Ju, 2016; Meuten, 2002; Santos et al., 2015; Santos et al., 2015; Tavasoly et al., 2013).

A formação tubular e o número de mitoses são obtidas através de uma análise semi quantitativa, já o pleomorfismo nuclear é classificado de modo mais subjetivo, de acordo com o tamanho, forma e coloração nuclear (Santos et al., 2015).

Canídeos com tumor de Grau III apresentam risco de morte 21 vezes superior aos animais com neoplasia de Grau I ou II (Case et al., 2017; Diessler et al., 2017; Goldschmidt et al., 2011).

Tabela 6 Estudos realizados para o Grau Histológico de carcinomas.

Autor	N	Sistema de classificação histológica	Grau Histológico dos Carcinomas	Valor do prognóstico	Conclusão
(Tavasoly et al., 2013)	37	2011	<ul style="list-style-type: none"> → 37,5% Grau I → 46,9% Grau II → 15,6% Grau III 	Útil	Há uma relação entre o Grau Histológico e a Classificação Histológica.
(Rasotto et al., 2017)	299	2011	<ul style="list-style-type: none"> → 51% Grau I → 14% Grau II → 35% Grau III 	Útil	<p>Tumores de Grau III com menor tempo de sobrevivência geral e mais agressivos. Tumores de Grau I e II com tempo de sobrevivência geral superior aos do Grau III.</p> <p>Há relação da Classificação Histológica com o Grau, com o Tempo de Sobrevivência Global e Taxa de Metastização à distância.</p>
(Im et al., 2014)	658	2011	<ul style="list-style-type: none"> → 65,3% Grau I → 21,8% Grau II → 12,9% Grau III 	_____	Grau III: Carcinoma Anaplástico, Carcinoma Adenoescamoso e alguns Sarcomas. Grau I: Carcinoma Tubular, Carcinoma Tubulopapilar e Carcinoma com Origem em Adenoma Complexo/Tumor Misto.
(Santos et al., 2015)	59	1999	<ul style="list-style-type: none"> → 24% Grau I → 37% Grau II → 39% Grau III 	Útil	Associação entre o tipo e o grau histológico. Tempo de sobrevivência livre de doença e sobrevivência global apresentam-se menores quanto mais alto for o grau histológico do tumor, especialmente para Grau III.
(Ressel et al., 2013)	35	1999	<ul style="list-style-type: none"> → 68,6% Grau I ou II → 31,4% Grau III 	_____	Maioria dos carcinomas complexos e 14 dos 24 Carcinomas Simples pertenceram ao Grau I ou II. Um Carcinoma Complexo e 10 dos 24 Carcinomas Simples pertenceram ao Grau III.
(Rasotto et al., 2012)	245	2011	<ul style="list-style-type: none"> → 8,3% Grau I → 49% Grau II → 94,2% Grau III 	Útil	Há aumento de risco de desenvolver metástases de acordo com os Graus Histológicos, sendo que o Grau I tem menor risco que o III.
(Asproni et al., 2015)	39	1999	<ul style="list-style-type: none"> → 40,6% Grau I → 31,3% Grau II → 28,1% Grau III 	_____	A maioria dos carcinomas era de Grau I, ou seja, bem diferenciados.
(Peña et al., 2013)	65	2011	<ul style="list-style-type: none"> → 44,61% Grau I → 29,23% Grau II → 26,15% Grau III 	Útil	<p>Quanto mais elevado o grau histológico maior a probabilidade de o animal morrer por causas relacionadas com a neoplasia. A sobrevivência média livre de doença é mais reduzida em tumores de Grau III que nos restantes.</p> <p>O grau histológico está associado com surgimento de recorrência e metastização, a maioria das neoplasias que sofrem recorrência e/ou metastização pertencem ao Grau III. A classificação histológica e o grau apresentaram-se relacionados.</p>
(Anadol et al., 2017)	29	2011	<ul style="list-style-type: none"> → 12 Grau I → 10 Grau II → 7 Grau III 	Útil	Tumores pouco diferenciados têm menor tempo de sobrevivência global. A expressão de COX-2 foi superior no Grau III que em graus bem diferenciados, levando a crer que o aumento da expressão de COX-2 poderá estar relacionado com o aumento da agressividade do tumor maligno canino.
(Hyun-Woo Kim, Ha-Young Lim, Jong-Il Shin, Byung-Joon Seung, Jung-Hyung Ju, 2016)	181	2011	<ul style="list-style-type: none"> → 65,2% Grau I → 28,7% Grau II → 6% Grau III 	Útil	Tumores com pior prognóstico tendem a inserir-se no grau histológico III.
(Gundim et al., 2016)	60	2011	<ul style="list-style-type: none"> → Carcinoma Complexo <ul style="list-style-type: none"> o 85,7% Grau I o 14,28% Grau II → Carcinoma Simples <ul style="list-style-type: none"> o 40% Grau I o 50% Grau II o 11% Grau III → Carcinoma Misto <ul style="list-style-type: none"> o 68,8% Grau I o 31,3% Grau II 	Útil	Neoplasias de Grau I apresentavam-se mais frequentemente com estadio I, II ou III.

Estudos sobre o grau histológico de malignidade (Tabela 6) referem que, quanto maior for o grau histológico do tumor, menor o TS global do indivíduo, maior a taxa de metastização e de recorrência. Para além disso constataram existir uma relação entre o grau e a classificação histológica como fatores de prognóstico (Rasotto 2017, Santos 2015, Rasotto 2012, Peña 2013, Anadol 2017, Hyun 2016, Tavasoly 2013).




Parâmetro	Score		
	1	2	3
 Formação Tubular	>75%	10-75%	<10%
 Pleomorfismo Nuclear	Ausente *	Moderado	Marcado
 Número de Mitoses	<9	9-17	>17
Score Final	3	4 5	6 7 8 9
	Grau I		Grau II
			Grau III

Figura 1 Grau Histológico de Nottingham. Adaptado de: (Anadol et al., 2017; Cassali et al., 2011; Goldschmidt et al., 2011; Meuten, 2002; Peña et al., 2013; Santos et al., 2015a; Santos et al., 2015b; Tavasoly et al., 2013).
Nota: * Células semelhantes às normais.

2.4. Tratamento

A excisão cirúrgica do tumor é o tratamento de eleição na maioria dos casos de TMC, exceto quando o animal apresenta metástases à distância ou nos carcinomas inflamatórios (Cassali et al., 2011; Araújo et al., 2015; Campos et al., 2016; Fossum, 2002; Guillemette, Rico, Godin, Boerboom, & Paquet, 2017; Kristiansen et al., 2016; Portela, Romano, & Briganti, 2014; Roberta Rasotto et al., 2017; Tavasoly et al., 2013; Vilhegas et al., 2015).

A dimensão da excisão cirúrgica depende do estadió, do tamanho e da localização do tumor (Araújo et al., 2015). Contudo, sempre que possível, a mesma deverá ser realizada com margens de dois centímetros de tecido sem patologia visível macroscopicamente (Lascelles, 2014). Os tumores que apresentem menos que um centímetro de diâmetro estão associados a tempos de sobrevida mais elevadas após excisão, sendo que tumores com dimensões compreendidas entre dois e três centímetros de diâmetro apresentam-se com bom prognóstico, com TS que vão de 22 a 24 meses (Cassali et al., 2011; Lascelles, 2014).

Os canídeos que possuam tumores mamários altamente malignos têm probabilidade elevada de recidiva da patologia após excisão cirúrgica, sendo que ocorrência de morte associada à doença é elevada (Arenas et al., 2016; Cassali et al., 2011).

Em indivíduos com micrometástases, com estadio avançado da doença, tumores invasivos e agressivos, em que a cirurgia não é suficiente para melhorar o prognóstico, é aconselhada a realização de outras terapias. Contudo, não estão descritas ainda *guidelines* para o efeito (Arenas et al., 2016; Cassali et al., 2011; Campos et al., 2016; Guillemette et al., 2017; Withrow & MacEven, 2013).

Por outro lado, os animais com carcinoma inflamatório não deverão ser sujeitos a excisão cirúrgica, uma vez que para além do estado avançado da doença poderá existir uma disseminação microscópica do tumor, coagulopatias locais e doença sistémica (Cassali et al., 2011; Araújo et al., 2015; Tiller, 2015; Marconato et al., 2009; Meuten, 2002; Withrow & MacEven, 2013). Neste caso deve recorrer-se à terapia com base em anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) (Arenas et al., 2016; Cassali et al., 2011; Araújo et al., 2015; Tiller, 2015; Marconato et al., 2009; Withrow & MacEven, 2013). Uma vez que a enzima COX-2 influencia a carcinogénese, estudos realizados comprovam que a administração de firocoxib, inibidor de COX-2, possui resultados anti tumorais em neoplasias altamente malignas, aumentando o tempo de sobrevida geral e tempo livre de doença (Arenas et al., 2016).

Adicionalmente quando se detetam metástases à distância, o tempo de sobrevida do animal é mais reduzido (Cassali et al., 2011; Demetriou, 2010; Malatesta, 2015). No estudo realizado por Demetriou (2010), os canídeos com carcinoma mamário metastizado a longa distância, após remoção do tumor primário, apresentaram TS de cinco meses, já em animais sem metástases o TS foi de 28 meses (Demetriou, 2010). Quando o tumor se localiza nas glândulas mais caudais, inicialmente este tipo de metástases surge predominantemente a nível pulmonar, e posteriormente poderá surgir nos linfonodos pré-escapulares, esternais ou inguinais, a nível hepático, renal ou ósseo (Cassali et al., 2011; Johnston, 1998; Lascelles, D. & Dobson, J. 2003; Perez Alenza et al., 2000; Withrow & MacEven, 2013).

Suspeita-se que o recurso à quimioterapia permite controlar as micrometástases (Malatesta, 2015). Os indivíduos com carcinoma ou sarcoma metastático deverão ser submetidos a quimioterapia. Contudo, ainda não se sabe qual a eficácia deste tipo de terapêutica (Mafalda & Oliveira, 2009).

Cerca de 40% a 60% dos animais submetidos apenas a excisão cirúrgica morrem devido a neoplasias, a maioria ocorre dois anos pós cirurgia (Lascelles, D. & Dobson, J. 2003).

Caso seja detetado neoplasia mamária numa cadela inteira poder-se-á realizar a OVH simultaneamente à mastectomia. Contudo, não parece haver ainda consenso relativamente à melhoria no prognóstico (Birchard, 2003; Demetriou, 2010; Johnston, 1998). A realização de OVH e excisão cirúrgica concomitantemente pode ter efeitos benéficos, visto diminuir o risco de metástases e o facto de causar atrofia das restantes glândulas mamárias, o que permite uma melhor deteção de novos tumores (Birchard, 2003). Os animais sujeitos a OVH com a remoção do tumor, ou submetidos

a OVH nos dois anos anteriores à mastectomia apresentaram uma tempo de sobrevida 45% superior às fêmeas inteiras ou às cadelas castradas há mais de dois anos após diagnóstico (Choi et al., 2016; Lascelles, 2014; Philibert et al., 2003).

Alguns estudos recentes referem que as fêmeas esterilizadas num momento temporalmente próximo da realização da excisão cirúrgica do tumor apresentam tempos de sobrevida mais elevadas, o que poderá estar relacionado com a presença de recetores hormonais na glândula mamária (Case et al., 2017; Philibert et al., 2003).

Se o tumor for maligno poder-se-á realizar apenas excisão cirúrgica ou excisão adjuvada com quimioterapia. Alguns estudos indicam que o tratamento com quimioterapia associada à excisão cirúrgica pode ser benéfico em alguns casos (Demetriou, 2010; Lascelles, 2014).

A recidiva do tumor apresenta um efeito negativo no tempo de sobrevida do animal, levando a taxas de mortalidade elevadas (Philibert et al., 2003). Carcinomas pouco diferenciados têm uma taxa de recidiva do tumor de 90% dois anos após cirurgia, os tumores moderadamente diferenciados de 68% de recorrência e os bem diferenciados de 24% dois anos pós cirurgia (Fossum, 2002).

Quanto mais tarde for determinado o diagnóstico da patologia menor o sucesso da terapêutica, conduzindo a pior prognóstico e menor tempo de sobrevida do animal (Malatesta, 2015).

A realização de mastectomia está relacionada com baixas taxas de morbilidade. Contudo, é uma cirurgia que, quanto mais agressiva for, mais complicações poderá originar no pós-operatório (Horta et al., 2015).

2.5. Biomarcadores Tecidulares

Apesar de a sua utilização clínica ainda não se encontrar generalizada, o recurso a técnicas de imunohistoquímica para caracterização de biomarcadores tissulares presentes em amostras de tumores mamários constitui uma importante ferramenta clínica, uma vez que permite fazer opções de tratamento que melhor se adequem às características do tumor e influencia o prognóstico (Kabir et al., 2017; Santos et al., 2013).

Os marcadores moleculares mais utilizados são 1) os recetores das hormonas sexuais - recetor de estrogénio e progesterona; 2) o recetor do fator de crescimento epidermal humano 2 (HER2/neu), importante na regulação de processos celulares; 3) o fator de suscetibilidade ao cancro mamário 1 (BRCA1), responsável pela reparação do ADN, regulação do ciclo celular e regulação transcricional e apoptose celular; 4) a proteína supressora tumoral p53; 5) a molécula de adesão celular E-caderina (Cassali et al., 2011; Ferreira, Bertagnolli, Cavalcanti, Schmitt, & Cassali, 2009; Kabel, 2017; Lascelles, 2014); 6) os marcadores de proliferação celular KI-67, o antigénio nuclear de proliferação celular (PCNA) e as regiões organizadoras nucleolares argirófilas (AgNOR) (Löhr, Teifke, Failing, 1997; Cassali et al., 2011; Lascelles, 2014; Peña, Nieto, Pérez-Alenza, Cuesta, & Castaño, 1998; Trere et al., 2008); 7) os inibidores do ciclo dependente da quinase p16, p21 e p27 (Hyun- Woo Kim, Jung-Hyung Ju, Jong-II Shin, Byung-Joon Seung, 2017) e 8) a enzima COX-2, que converte o ácido araquidónico em diferentes prostaglandinas (Asproni et al., 2015; Brunetti, Sarli, Preziosi,

Monari, & Benazzi, 2005; Gama, Paredes, Gärtner, Alves, & Schmitt, 2008; Lascelles, 2014; Nowak, Madej, Pula, Dziegiel, & Ciaputa, 2016).

Na Tabela 7 encontram-se resumidos os resultados de diferentes estudos sobre o valor prognóstico de diferentes biomarcadores tecidulares em tumores mamários de cadelas.

Os recetores hormonais encontram-se presentes em aproximadamente 50% dos tumores mamários malignos e em 70% dos benignos, o que poderá estar relacionado com uma diminuição de dependência de hormonas esteróides à medida que a doença evolui para a malignidade, dando origem a tumores mais indiferenciados e com maior agressividade (Fossum, 2002; Lascelles, D. & Dobson, J. 2003; Philibert et al., 2003; Withrow, S., & Vail, 2007). Os tumores mamários de cadelas que preservam os recetores de estrogénios e progesterona, ou apenas de estrogénios, são geralmente benignos ou de baixa malignidade, pelo que estão associados a um melhor prognóstico. Os tumores malignos apresentam uma diminuição na expressão destes recetores (Demetriou, 2010; Kim et al., 2016; Tiller, 2015; Lascelles, D. & Dobson, J. 2003; Lascelles, 2014; Philibert et al., 2003; Withrow & MacEven, 2013). PR encontra-se diminuído quanto mais agressivo for o tumor, estando relacionado com diminuição do tempo de sobrevivência (Ferreira et al., 2009; Nguyen et al., 2017).

Os carcinomas mistos apresentam, em geral, maior expressão de recetores hormonais do que os carcinomas simples. Os carcinomas diferenciados também apresentam maior expressão de recetores hormonais que os indiferenciados (Lascelles, 2014; Meuten, 2002).

Em relação à expressão do HER-2/neu, os animais com tumores que expressem este marcador apresentam tumores de grau histológico III, ou seja, com mau prognóstico, caracterizados por crescimento invasivo e com ausência de recetores hormonais (Cassali et al., 2011; Kabir et al., 2017; Lascelles, 2014; Muhammadnejad, Keyhani, Mortazavi, Behjati, & Haghdoost, 2012; Ressel et al., 2013).

Tal como em medicina humana, as mutações no gene BRCA1 estão também associadas ao desenvolvimento de TMC (Sugiura et al., 2007; Sun et al., 2015). A diminuição da expressão nuclear do BRCA1 está associada ao desenvolvimento de tumores mamários malignos, a uma sobreexpressão de Ki-67 e ausência de expressão de recetores de estrogénios (Lascelles, 2014; Qiu et al., 2015; Sugiura et al., 2007). Esta diminuição e distribuição anómala da BRCA1 está relacionada com a malignidade do tumor (Lascelles, 2014; Sugiura et al., 2007).

A mutação do gene supressor tumoral p53 está associada ao desenvolvimento tumoral, ao aumento da malignidade, e conseqüentemente a um pior prognóstico (Dolka, Król, & Sapierzyński, 2016; Kumaraguruparan, Prathiba, & Nagini, 2006; Lascelles, 2014; Oliveira et al., 2017).

Mutações em p16 originam expressão do mesmo em tumores com taxas de malignidade elevadas (Hyun- Woo Kim, Jung-Hyung Ju, Jong-Il Shin, Byung-Joon Seung, 2017). A maioria dos tumores benignos têm expressão positiva para p21 e p27, já os malignos apresentam-se com expressão negativa para ambas as proteínas (Hyun- Woo Kim, Jung-Hyung Ju, Jong-Il Shin, Byung-Joon Seung, 2017).

A diminuição da expressão da E-caderina apresenta-se relacionada com a indiferenciação tumoral e com a capacidade de invasão e de metastização (Asproni et al., 2015; Brunetti et al., 2005;

Gama et al., 2008; Lascelles, 2014; Nowak et al., 2016), estando associada a um tempo livre de doença e a uma sobrevida global também mais curtas (Asproni et al., 2015; Gama et al., 2008; Lascelles, 2014; Nowak et al., 2016).

No que diz respeito à Cicloxigenase -2 (COX-2), os seus valores encontram-se aumentados em tumores malignos e mais agressivos (Anadol et al., 2017; Arenas et al., 2016; Raposo, Pires, Prada, Queiroga, & Argyle, 2017).

A avaliação da proliferação celular através dos marcadores de proliferação Ki-67, AgNOR ou o PCNA indicam que os tumores malignos apresentam maior expressão destes marcadores de proliferação do que os tumores benignos; e que em relação aos tumores malignos, quanto mais elevada for a proliferação celular, pior o será o prognóstico e maior a probabilidade de o tumor manifestar um grau histológico elevado (Arenas et al., 2016; Löhr, Teifke, Failing, 1997; Carvalho et al., 2016; Cassali et al., 2011; Ferreira et al., 2009; Kumaraguruparan et al., 2006; Lascelles, 2014; Muhammadnejad et al., 2012; Nguyen et al., 2017; Nowak et al., 2016; Peña et al., 1998; Santos et al., 2013; Trere et al., 2008).

Tabela 7 Estudos realizados para marcadores moleculares e sua relação com o valor de prognóstico.

Marcador	Autor	N	Sistema de classificação histológica	Valor do Prognóstico	Comentário
AgNOR	(Trere, Flagstad, Jensen, & Hellme, 2008)	73	Sem dados.	Útil	Quanto maior a expressão de AgNOR maior a malignidade do tumor.
	(C. V. Löhr, J. P. Teifke, K. Failing, 1997)	96	1999	Útil	Com o aumento de malignidade há aumento de áreas de AgNOR.
BRCA1	(Im et al., 2013)	292	2011	_____	Forte associação entre a raça e a expressão de BRCA1.
	(Sugiura et al., 2007)	24	1999	_____	Diminuição da expressão de BRCA1 associada à gênese de tumor em alguns casos de tumores mamários.
	(Ciu et al., 2015)	40	Sem dados.	_____	Valores diminuídos em tumores benignos e malignos comparativamente com o tecido mamário normal. Expressão diminuída em tumores mamários malignos.
COX-2	(Raposo, Pires, Prada, Queiroga, & Argyle, 2017)	32	1999	Útil	Altos valores de COX-2 associados a tumores mamários malignos.
	(Anadol et al., 2017)	35	2011	Útil	Tumores de Grau III com valores mais elevados que os restantes. Aumento de expressão de COX-2 está associada a pior prognóstico.
	(Arenas, Peña, Granados-Soler, & Pérez-Alenza, 2016)	28	2011	Útil	Expressão aumentada associada à malignidade e tipo de tumor.
E-Caderina	(Nowak, Madej, Pula, Dziegiel, & Ciaputa, 2016)	32	2011	Útil	Expressão diminuída em tumores que metastizaram comparativamente com tumores que não metastizaram.
	(Brunetti, Sarli, Preziosi, Monari, & Benazzi, 2005)	60	1999	_____	Diminuição relacionada com o carácter invasivo. E-Caderina tem pouca influência na sobrevivência do animal.
	(Gama, Paredes, Gärtner, Alves, & Schmitt, 2008)	65	1999	Útil	Redução da expressão com relação com: o grau de infiltração tumoral, grau histológico mais elevado, tumores pouco diferenciados, alto grau de invasão, metástases nos linfonodos, menor sobrevivência livre de doença e sobrevivência global.
	(Asproni, Ressel, Millanta, Vannozzi, & Poli, 2015)	39	1999	Útil	Cadelas com neoplasia positiva para o marcador têm maior tempo de sobrevivência global e ausência de invasão linfática.
ER	(Kumaraguruparan, Prathiba, & Nagini, 2006)	30	1974	_____	Expressão do marcador com mutação aumentada nos tumores mamários comparativamente com o tecido adjacente sem neoplasia.
	(Nguyen et al., 2017)	350	2011	_____	58% das amostras não expressaram ER. Período livre de doença médio: 34,4 meses. Sobrevivência geral média: 11,4 meses.
	(Kabir et al., 2017)	6	2011	_____	Cinco amostras com níveis de ER basais, a restante amostra com níveis de ER de 45% dos níveis detetados em células mamárias normais.
HER-2/neu	(Ressel et al., 2013)	46	1999	Sem utilidade	Sobre-expressão de HER-2 não relaciona o tipo de tumor com um prognóstico pior.
	(Nguyen et al., 2017)	350	2011	_____	Período livre de doença médio: 34,4 meses. sobrevivência geral média: 11,4 meses.
	(Muhammadnejad, Keyhani, Mortazavi, Behjati, & Haghdoost, 2012)	35	2011	Útil	A amplificação de HER-2/neu e sobre expressão causa diminuição de tempo livre de doença e tempo de sobrevivência.
	(Kabir et al., 2017)	6	2011	Útil	Há sobre-expressão de HER-2 na maioria dos tumores mamários caninos.
Ki-67	(Nowak et al., 2016)	32	2011	Útil	Sobre-expressão de Ki-67 em tumores que metastizaram que os que não desenvolveram metástases.
	(Ferreira, Bertagnolli, Cavalcanti, Schmitt, & Cassali, 2009)	120	1999	Útil	Índice de proliferação superior para tumores TIII que para tumores TI e TII. Tumores malignos com taxas de proliferação mais elevadas que tumores benignos. Índices de proliferação elevados estão associados a baixa expressão de PR, tempo de sobrevivência global menor e elevado risco de desenvolvimento de metástases.
	(Santos et al., 2013)	85	2011	Útil	Ki-67 é um marcador de prognóstico de tumores mamários malignos.
	(Carvalho, Pires, Prada, Lobo, & Queiroga, 2016)	64	1999	Útil	Índice de proliferação de Ki-67 elevado demonstrou menor tempo de sobrevivência geral e maior agressividade.
	(C. V. Löhr, J. P. Teifke, K. Failing, 1997)	96	1999	_____	Tumores malignos com valores de Ki-67 elevados.
	(Peña, Nieto, Pérez-Alenza, Cuesta, & Castaño, 1998)	115	Sem dados.	Útil	Níveis de proliferação de Ki-67 reduzidos em tumores benignos, tumores malignos verificou-se o oposto. Tumores malignos com metástases e envolvimento dos linfonodos, taxas de sobrevivência livre de doença reduzidas e baixa taxa de sobrevivência geral.

Ki-67	(Arenas et al., 2016)	28	2011	Útil	Valores elevados: tumores altamente malignos com prognóstico pouco favorável.
	(Nguyen et al., 2017)	350	2011	_____	Período livre de doença médio: 34,4 meses. Sobrevida geral média :11,4 meses.
	(Muhammadnejad et al., 2012)	35	2011	Útil	Índices elevados: maior malignidade.
PCNA	(Kumaraguruparan et al., 2006)	30	1974	Útil	Expressão do marcador com mutação aumentada nos tumores mamários comparativamente com o tecido adjacente sem neoplasia.
	(Carvalho et al., 2016)	64	1999	Útil	Índice de proliferação de PCNA elevado demonstrou menor tempo de sobrevivência geral e maior agressividade.
	(C. V. Löhr, J. P. Teifke, K. Failing, 1997)	96	1999	Útil	Tumores malignos com valores de PCNA elevados.
	(Peña et al., 1998)	115	Sem dados.	Útil	Níveis elevados de PCNA relacionados com tumores malignos.
PR	(Ferreira et al., 2009)	120	1999	Útil	TII maioritariamente como malignos e com baixa expressão de PR. Índices de proliferação elevados associados a baixa expressão de PR, tempo de sobrevivência global menor e elevado risco de desenvolvimento de metástases.
	(Nguyen et al., 2017)	350	2011	_____	65,4% não expressaram PR. Período livre de doença médio: 34,4 meses. Sobrevida geral média: 11,4 meses.
	(Kabir et al., 2017)	6	2011	_____	Quatro amostras com níveis basais de PR, uma amostra com 60% de expressão dos níveis detetados em células mamárias normais e outra com níveis 2,7 vezes superior às células mamárias normais.
p53	(Kumaraguruparan et al., 2006)	30	1974	Útil	Expressão do marcador com mutação aumentada nos tumores mamários comparativamente com o tecido adjacente sem neoplasia.
	(Dolka, Król, & Sapieryński, 2016)	40	2011	Útil	Expressão em tumores malignos relacionada com: < diferenciação tumoral, crescimento invasivo, tumores mais agressivos e tumores com grau histológico mais avançado.
p16, p21, p27	(Hyun- Woo Kim, Jung-Hyung Ju, Jong-Il Shin, Byung-Joon Seung, 2017)	188	Sem dados.	Útil	Mutações no p16 levam à sua expressão e taxas de malignidade altas e deficiência de estrogénio. > dos tumores benignos com expressão positiva para p21 e p27, os malignos têm expressão negativa para ambas as proteínas.
TP53	(Oliveira et al., 2017)	40	2011	Sem utilidade	Não há relação entre variações na expressão do gene e a agressividade histológica dos tumores mamários caninos ou crescimento tumoral.

AgNOR – Regiões Organizadoras Nucleolares Argirófilas (Argyrophilic Nucleolar Organizer Region); BRCA1 – Gene de Suscetibilidade ao Cancro Mamário 1 (breast cancer 1); COX-2 – Cicloxigenase 2 (Cyclooxygenase 2); ER – Recetores de Estrogénio (Estrogen Receptor); Her-2/neu – Recetor do Fator de Crescimento Epidermal Humano 2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2); PCNA – Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (Proliferating Cell Nuclear Antigen); PR – Recetores de Progesterona (Progesterone Receptor).

2.6. Biomarcadores Séricos

O recurso a biomarcadores séricos poderá ser uma mais valia na prática clínica de Medicina Veterinária, uma vez que estes se apresentam menos invasivos. Contudo, ainda são poucos os estudos que avaliaram estes marcadores e o seu impacto como potenciais fatores de prognóstico (Campos et al., 2012; Gabriela Bottaro Gelaleti, Jardim, Leonel, Moschetta, & Zuccari, 2012).

Os biomarcadores mais estudados são o antígeno cancerígeno 15-3 (CA15-3), que é um carboidrato que está ligado a um antígeno proteico designado de mucina, codificada pelo gene MUC1, que está relacionada com a adesão celular; e o antígeno carcino-embriónico (CEA), que é uma glicoproteína produzida por células normais da mucosa gastrointestinal que está envolvida na adesão intercelular (Campos et al., 2012; Manuali et al., 2012). Outros exemplos incluem a lactato desidrogenase (LDH), enzima essencial no metabolismo celular anaeróbico; a interleucina 8 (IL-8), citocina envolvida na invasão do tumor mamário e na angiogénese; a interleucina 10 (IL-10), citocina correlacionada com a associação tumor – imunossupressão; o antígeno HER2; a mucina 1 (MUC1), que desempenha uma função crucial na regulação de propriedades celulares, tais como proliferação celular, apoptose, adesão e invasão; a timidina quinase (TK1), enzima citosólica do ADN; as sequências de CAN SINE (elementos nucleares intercalados curtos) e a mamoglobina B, proteína cuja função biológica ainda não é conhecida (Campos et al., 2012; Campos et al., 2015; Andrés et al., 2013; Gabriela B. Gelaleti et al., 2014; Gabriela Bottaro Gelaleti et al., 2012; Jagarlamudi, Westberg, Rönnerberg, & Eriksson, 2014; Pandey, Kumar, & Verma, 2015).

Na Tabela 8 é apresentado um resumo dos estudos bibliográficos sobre marcadores séricos e respectivo valor prognóstico.

No que se refere ao marcador CA 15-3, parece haver uma relação entre o aumento dos valores deste marcador com o estadió clínico da doença. Os valores tendem a aumentar de acordo com a progressão tumoral, havendo também uma relação com o grau histológico de malignidade (Campos et al., 2012; Manuali et al., 2012; Valencakova-Agyagosova et al., 2014). Os valores de CEA apresentam-se superiores em animais com TMC quando comparado com animais saudáveis. Contudo, estes valores elevados poderão não estar presentes em todas as amostras de animais com neoplasia, ou poderão existir valores normais em animais doentes (Valencakova-Agyagosova et al., 2014). Os autores concluíram não haver relação do CEA com o estadió clínico da doença (Campos et al., 2012; Valencakova-Agyagosova et al., 2014). De acordo com os trabalhos de Campos et al. (2012) e Valencakova-Agyagosova (2014) o marcador CEA e HER2 não apresenta valor prognóstico. Em relação às IL-8 e IL-10, os estudos de Andrés et al. (2013) e de Gelaleti et al. (2012) demonstram que os seus valores aumentavam em função da malignidade tumoral. Especificamente em relação à IL-10, os níveis encontraram-se mais elevados em animais com carcinoma inflamatório (de Andrés et al., 2013). Foram verificados valores mais elevados de TK1 em animais com TMC quando comparados com animais saudáveis (Jagarlamudi et al., 2014). Foram igualmente observados valores mais elevados de LDH em neoplasias em estado avançado, estando este marcador relacionado com pior prognóstico do TMC (Campos et al., 2012). A mamoglobina B

pode também ser utilizada como marcador sérico (Pandey et al., 2015). Foram detetados valores superiores de MUC1 em animais com metástases nos linfonodos regionais, havendo assim uma relação de MUC1 com a progressão da doença (Campos et al., 2015). Por fim as sequências de CAN SINE poderão ser utilizadas como marcadores moleculares uma vez que foi verificado um aumento do número de cópias em indivíduos com tumor. Este marcador está relacionado com a diminuição do tempo de sobrevivência (Gelaleti et al., 2014).

Tabela 8 Estudos realizados para marcadores séricos e sua relação com o valor de prognóstico.

Marcador	Autor	N	Ano de Classificação Histológica	Valor do prognóstico	Comentário
CA15-3	(L. C. Campos et al., 2012)	90	2011	Útil	Pode ser usado para distinguir carcinoma metastásico de não metastásico. Aumento das concentrações séricas do marcador é proporcional ao estadio clínico da doença.
	(Manuali et al., 2012)	57	1999	Útil	Valores aumentam com a progressão tumoral, há relação com o grau histológico de malignidade tumoral.
	(Valencakova-Agyagosova et al., 2014)	45	1999	Útil	Valores superiores em animais com TMC comparativamente aos animais saudáveis. Correlação entre o aumento dos valores do marcador e o estadio da doença.
CEA	(L. C. Campos et al., 2012)	90	2011	Sem utilidade	Ausência de diferenças entre amostras.
	(Valencakova-Agyagosova et al., 2014)	45	1999	Sem utilidade	Não se observou relação entre o estadio da doença e o aumento dos valores do marcador.
HER2	(Liliane C. Campos et al., 2015)	48	2011	Sem utilidade	Concentrações não se revelaram significativamente diferentes entre os grupos de animais saudáveis e doentes.
IL-8	(de Andrés et al., 2013)	48	1999	Útil	Valores aumentaram com o aumento da malignidade tumoral.
	(Gabriela Bottaro Gelaleti et al., 2012)	80	Sem dados	Útil	Citoquina é essencial para determinar a progressão e recorrência da doença. Níveis elevados associados a pior prognóstico.
IL-10	(de Andrés et al., 2013)	48	1999	Útil	Valores superiores em indivíduos com carcinoma inflamatório comparativamente com animais com tumor mamário maligno não inflamatório, níveis inferiores em amostras de animais saudáveis comparativamente com as restantes amostras.
TK1	(Jagarlamudi et al., 2014)	47	Sem dados	Útil	Valores superiores em animais com TMC comparativamente a animais saudáveis.
LDH	(L. C. Campos et al., 2012)	90	2011	Útil	Elevadas concentrações em metástases regionais e à distância, ou seja, em neoplasias em estado avançado. Concentrações sanguíneas estão aumentadas com a evolução da patologia, e associadas a um prognóstico mau.
Mamoglobina B	(Pandey et al., 2015)	20	Sem dados	Útil	Detetados níveis elevados de mamoglobina B em circulação.
MUC1	(Liliane C. Campos et al., 2015)	48	2011	Útil	Concentrações de MUC1 relacionadas com a progressão da doença.
	(Gabriela B. Gelaleti et al., 2014)	78	1999	Útil	Aumento de número de cópias em fêmeas com tumor mamário e relação com menor tempo de sobrevivência.

CA 15-3 – Antígeno Cancerígeno 15-3 (Cancer Antigen 15-3); CEA – Antígeno Carcino-embrionário (Carcinoembryonic Antigen); Her-2/neu – Fator de Crescimento Epidermal Humano 2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2); IL - 8 – Interleucina 8; IL- 10 – Interleucina 10; TK1 – Timidina Quinase (Thymidine Kinase 1); LDH – Lactato Desidrogenase (Lactate Dehydrogenase); MUC1 – Mucina 1 (Mucin 1).

Considerações Finais

O TCM é o tumor mais frequente em cadelas, estimando-se que surjam aproximadamente 310 a 958 novos casos anuais por cada 100.000 animais. A incidência de TCM apresenta variação geográfica, sendo mais frequente em áreas onde a castração precoce das cadelas não é realizada de forma generalizada.

Vários fatores têm sido identificados como fatores de risco, tais como a idade, raça, a exposição a hormonas gonadais ou seus análogos, a idade de realização da ovariectomia e obesidade. Fêmeas com idade compreendida entre os nove e os onze anos estão mais predispostas a desenvolver tumor mamário maligno. Quanto mais cedo for realizada a supressão de exposição a hormonas ováricas através de ovariectomia, maiores os benefícios para o animal. Animais obesos em idades jovens e com dietas incorretas revelam ter maior vulnerabilidade para desenvolverem neoplasia mamária.

A evolução clínica dos tumores malignos é muito variável, sendo que o tempo livre de doença e o tempo de sobrevivida podem variar entre poucos meses a vários anos. Por esse motivo é importante identificar fatores de prognóstico, que permitam por um lado fazer uma melhor caracterização do tumor, e por outro auxiliar na escolha da melhor opção de tratamento para cada tipo de tumor.

Os fatores de prognóstico mais utilizados são a classificação TNM e o estadio clínico, a classificação histológica e o grau histológico de *Nottingham*. Há uma correlação entre o tamanho do tumor e a malignidade do mesmo. Se existir afeção dos linfonodos regionais e se houver metástases à distância, haverá uma diminuição do TS geral do animal. Quanto mais elevado for o grau histológico, menor será o TS global do indivíduo, maior a taxa de recorrência e de metastização. A classificação histológica de 2011 é uma atualização da anterior (1999), sendo que introduz cinco novos subtipos de tumores, sendo estes o Carcinoma Micropapilar Invasivo, Comedocarcinoma, Carcinoma Ductal, Carcinoma Papilar Intraductal e Carcinoma e Mioepitelioma Maligno. Os tumores epiteliais são os mais frequentemente observados na prática clínica. É de concordância geral que os Carcinomas Inflamatórios possuem um prognóstico pobre, com TS geral reduzido.

A excisão cirúrgica completa de tumor sem metástases apresenta-se como o tratamento com maior taxa de cura.

O recurso à utilização de marcadores tecidulares ainda é pouco usual. A expressão de BRCA1 revela-se diminuída em tumores malignos, no que toca à COX-2, os valores encontram-se aumentados em tumores malignos e nos mais agressivos, levando a uma menor sobrevivida do animal. A expressão de E-caderina encontra-se reduzida em tumores que desenvolveram metastização. A diminuição da mesma está relacionada com a invasibilidade e a malignidade do tumor. O ER tem expressão aumentada em tumores malignos, já o PR encontra-se diminuído quanto mais agressivo for o tumor, estando assim relacionado com diminuição do TS. A avaliação dos marcadores de

proliferação Ki-67, AgNOR ou PCNA permitem melhor caracterizar os tumores, sendo que em relação aos tumores malignos, quanto mais elevada for a proliferação celular, pior o será o prognóstico.

A expressão do marcador p53 com mutação está associada a tumores malignos. Mutações em p16 estão associadas à expressão do mesmo em tumores com taxas de malignidade elevadas. A maioria dos tumores benignos têm expressão positiva para p21 e p27, já os malignos apresentam-se com expressão negativa para ambas as proteínas. Relativamente ao marcador HER-2, a sua sobreexpressão está associada a pior prognóstico.

O recurso a marcadores séricos poderá ser uma mais valia na prática clínica de Medicina Veterinária, uma vez que estes se apresentam monetariamente acessíveis e são um método pouco invasivo. Os marcadores séricos que poderão ser utilizados como fatores de prognóstico são o CA 15-3, as interleucinas 8 e 10, o TK1, o LDH, a mamoglobina B, a MUC1 e as sequências de CAN SINE. Contudo, alguns autores defendem que CEA e HER2 não poderão ser considerados marcadores séricos. Na medicina humana os marcadores séricos mais válidos são o CEA e o MUC1. Contudo, em cadelas, ainda é necessário realizar mais estudos de modo a que se perceba a sua utilidade. Tal como nos humanos, o TMC surge de uma combinação de fatores genéticos e ambientais. Neste âmbito, os canídeos são usados como modelo biológico de modo a que se determine novos tipos de tratamento e abordagens à patologia em causa.

Os relatórios histopatológicos não deverão apenas incluir um tipo de fator de prognóstico, mas sim vários, de modo a que a sua interpretação conjunta leve a um diagnóstico correto e mais preciso, bem como a possibilidade de se optar pela terapia mais adequada.

Os fatores de prognóstico dos tumores mamários caninos apresentam-se de grande relevância devido à elevada incidência destes tumores e pelas implicações clínicas que a utilização destes fatores de prognóstico podem apresentar. Adicionalmente, os tumores mamários da cadela têm também sido usados como modelos biológicos espontâneos dos tumores mamários em humanos.

Bibliografia

- Andrés, P. J., Illera, J. C., Cáceres, S., Díez, L., Pérez-Alenza, M. D., & Peña, L. (2013). Increased levels of interleukins 8 and 10 as findings of canine inflammatory mammary cancer. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 152(3–4), 245–251.
- Araújo, M. R., Campos, L. C., Ferreira, E., & Cassali, G. D. (2015). Quantitation of the Regional Lymph Node Metastatic Burden and Prognosis in Malignant Mammary Tumors of Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29(5), 1360–1367.
- Anadol, E., Yar Saglam, A. S., Gultiken, N., Karakas, K., Alcigir, E., Alkan, H., & Kanca, H. (2017). Expression of iNOS, COX-2 and VEGF in canine mammary tumours and non-neoplastic mammary glands: Association with clinicopathological features and tumour grade. *Acta Veterinaria Hungarica*, 65(3), 382–393.
- Andreassen, E. B., Nielsen, O. L., Tranholm, M., Knudsen, T., & Kristensen, A. T. (2016). Expression of tissue factor in canine mammary tumours and correlation with grade, stage and markers of haemostasis and inflammation. *Veterinary and Comparative Oncology*, 14(2), 191–201.
- Antunes, S. (2014). *Feline mammary tumours: a literature review*, Escola Universitária Vasco da Gama.
- Arenas, C., Peña, L., Granados-Soler, J. L., & Pérez-Alenza, M. D. (2016). Adjuvant therapy for highly malignant canine mammary tumours: Cox-2 inhibitor versus chemotherapy: A case-control prospective study. *Veterinary Record*, 179(5), 125.
- Asproni, P., Ressel, L., Millanta, F., Vannozzi, I., & Poli, A. (2015). Co-localization of PTEN and E-cadherin in canine mammary hyperplasias and benign and malignant mammary tumors. *Research in Veterinary Science*, 103, 113–118.
- Baioni, E., Scanziani, E., Vincenti, M. C., Leschiera, M., Bozzetta, E., Pezzolato, M., ... Ru, G. (2017). Estimating canine cancer incidence: Findings from a population-based tumour registry in northwestern Italy. *BMC Veterinary Research*, 13(1), 1–9.
- Birchard SJ, S. R. (2003). *Manual Saunder's Clínica de Pequenos Animais*.
- Brunetti, B., Sarli, G., Preziosi, R., Monari, I., & Benazzi, C. (2005). E-cadherin and β -catenin reduction influence invasion but not proliferation and survival in canine malignant mammary tumors. *Veterinary Pathology*, 42(6), 781–787.
- Löhr C. V., Teifke J. P., Failing K., E. W. (1997). Characterization of the Proliferation State in Canine Mammary Tumors by the Standardized AgNOR Method with Postfixation and Immunohistologic Detection of Ki-67 and PCNA. *Vet Pathol*, 212–221.
- Campos, L. C., Lavallo, G. E., Estrela-Lima, A., Melgaço de Faria, J. C., Guimarães, J. E., Dutra, Á. P., Cassali, G. D. (2012). CA15.3, CEA and LDH in Dogs with Malignant Mammary Tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 26(6), 1383–1388.
- Campos, L. C., Silva, J. O., Santos, F. S., Araújo, M. R., Lavallo, G. E., Ferreira, E., & Cassali, G. D. (2015). Prognostic significance of tissue and serum HER2 and MUC1 in canine

mammary cancer. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 27(4), 531–535.

Campos, C. B., Lavalle, G. E., Fialho Ligório, S., Camargo Nunes, F., Carneiro, R. A., Amorim, R. L., & Cassali, G. D. (2016). Absence of significant adverse events following thalidomide administration in bitches diagnosed with mammary gland carcinomas. *Veterinary Record*, 179(20), 514.

Carvalho, M. I., Pires, I., Prada, J., Lobo, L., & Queiroga, F. L. (2016). Ki-67 and PCNA Expression in Canine Mammary Tumors and Adjacent Nonneoplastic Mammary Glands: Prognostic Impact by a Multivariate Survival Analysis. *Veterinary Pathology*, 53(6), 1138–1146.

Case, A., Brisson, B. K., Durham, A. C., Rosen, S., Monslow, J., Buza, E., ... Volk, S. W. (2017). Identification of prognostic collagen signatures and potential therapeutic stromal targets in canine mammary gland carcinoma. *PLoS ONE*, 12(7), 1–19.

Cassali, G. D., Lavalle, G. E., Nardi, a. B. De, Ferreira, E., Bertagnolli, a. C., Estrela-Lima, A., ... Souza, C. M. (Et A. (2011). Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors - 2013. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, 4(2), 153–180.

Choi, J.-W., Yoon, H.-Y., & Jeong, S.-W. (2016). Clinical Outcomes of Surgically Managed Spontaneous Tumors in 114 Client-owned Dogs. *Immune Network*, 16(2), 116–25.

Damasceno, K. A., Bertagnolli, A. C., Estrela-Lima, A., Ribeiro, L. G. R., Rabelo, B. S., Campos, C. B., ... Cassali, G. D. (2012). Versican expression in canine carcinomas in benign mixed tumours: Is there an association with clinical pathological factors, invasion and overall survival? *BMC Veterinary Research*, 8.

Demetriou, R. F. J. (2010). *Small Animal Oncology- Saunders Solutions in Veterinary Practice*. p. 161,162,163,164,165,197.

Diessler, M. E., Castellano, M. C., Portiansky, E. L., Burns, S., & Idiart, J. R. (2017). Canine mammary carcinomas: influence of histological grade, vascular invasion, proliferation, microvessel density and VEGFR2 expression on lymph node status and survival time. *Veterinary and Comparative Oncology*, 15(2), 450–461.

Dobson JM, Samuel S, Milstein H, Rogers K, W. J. (2002). Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *J Small Anim Pract*.

Dolka, I., Król, M., & Sapieryński, R. (2016). Evaluation of apoptosis-associated protein (Bcl-2, Bax, cleaved caspase-3 and p53) expression in canine mammary tumors: An immunohistochemical and prognostic study. *Research in Veterinary Science*, 105, 124–133.

Egenvall, A., Bonnett, B. N., Öhagen, P., Olson, P., Hedhammar, Å., & Von Euler, H. (2005). Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Preventive Veterinary Medicine*, 69(1–2), 109–127.

Elston CW, E. I. (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 41: 154-61 (2002) 41(3A) 151-153.

Feliciano, M. A. R., Uscategui, R. A. R., Maronezi, M. C., Simões, A. P. R., Silva, P., Gasser, B., Vicente, W. R. R. (2017). Ultrasonography methods for predicting malignancy in

canine mammary tumors. *PLoS ONE*, 12(5), 1–14.

Ferreira, E., Bertagnolli, A. C., Cavalcanti, M. F., Schmitt, F. C., & Cassali, G. D. (2009). The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, 7(4), 230–235.

Fossum, T. W. (2002). *Small Animal Surgery* (Second Edi). p. 632-638.

Gama, A., Paredes, J., Gärtner, F., Alves, A., & Schmitt, F. (2008). Expression of E-cadherin, P-cadherin and β -catenin in canine malignant mammary tumours in relation to clinicopathological parameters, proliferation and survival. *Veterinary Journal*, 177(1), 45–53.

Gelaleti, G. B., Granzotto, A., Leonel, C., Jardim, B. V., Moschetta, M. G., Carareto, C. M. A., & Zuccari, D. A. P. D. C. (2014). Short interspersed CAN SINE elements as prognostic markers in canine mammary neoplasia. *Oncology Reports*, 31(1), 435–441.

Gelaleti, G. B., Jardim, B. V., Leonel, C., Moschetta, M. G., & Zuccari, D. A. P. de C. (2012). Interleukin-8 as a prognostic serum marker in canine mammary gland neoplasias. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 146(2), 106–112.

Goldschmidt, M. H., Peña, L., Rasotto, R., & Zappulli, V. (2011). Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*, 48(1), 117–131.

Grüntzig, K., Graf, R., Boo, G., Guscelli, F., Hässig, M., Axhausen, K. W., ... Pospischil, A. (2016). Swiss Canine Cancer Registry 1955-2008: Occurrence of the Most Common Tumour Diagnoses and Influence of Age, Breed, Body Size, Sex and Neutering Status on Tumour Development. *Journal of Comparative Pathology*, 155(2–3), 156–170.

Guillemette, S., Rico, C., Godin, P., Boerboom, D., & Paquet, M. (2017). In Vitro Validation of the Hippo Pathway as a Pharmacological Target for Canine Mammary Gland Tumors. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 22(3), 203–214.

Gundim, L. F., de Araújo, C. P., Blanca, W. T., Guimarães, E. C., & Medeiros, A. A. (2016). Clinical staging in bitches with mammary tumors: Influence of type and histological grade. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 80(4), 318–322.

Hahn, K. A., & Richardson, R. C. (1992). Canine Malignant Mammary Neoplasia : Biological Behavior , Diagnosis , and Treatment Alternatives Canine Malignant Mammary Neoplasia : Biological Behavior , Diagnosis , and Treatment Alternatives, (July).

Harting, T. P., Stubbendorff, M., Hammer, S. C., Schadzek, P., Ngezahayo, A., Escobar, H. M., & Nolte, I. (2017). Dichloroacetate affects proliferation but not apoptosis in canine mammary cell lines. *PLoS ONE*, 12(6), 1–18.

Horta, R. S., Figueiredo, M. S., Lavallo, G. E., Costa, M. P., Cunha, R. M. C., & Araújo, R. B. (2015). Surgical stress and postoperative complications related to regional and radical mastectomy in dogs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 57(1), 1–10.

Hyun- Woo Kim, Jung-Hyung Ju, Jong-Il Shin, Byung-Joon Seung, J.-H. S. (2017). Differential and correlated expressions of p16/p21/p27/p38 in mammary gland tumors of aged dogs, 18(4), 479–485.

Hyun-Woo Kim, Ha-Young Lim, Jong-Il Shin, Byung-Joon Seung, Jung-Hyung Ju, and

J.-H. S. (2016). Breed- and age-related differences in canine mammary tumors. *Can J Vet Res.*, 80(2), 146–155.

Im, K. S., Kim, N. H., Lim, H. Y., Kim, H. W., Shin, J. I., & Sur, J. H. (2014). Analysis of a New Histological and Molecular-Based Classification of Canine Mammary Neoplasia. *Veterinary Pathology*, 51(3), 549–559.

Moulton, J. (1990). Tumors in Domestic Animals. 3rd ed, p. 518-49.

Jagarlamudi, K. K., Westberg, S., Rönnerberg, H., & Eriksson, S. (2014). Properties of cellular and serum forms of thymidine kinase 1 (TK1) in dogs with acute lymphocytic leukemia (ALL) and canine mammary tumors (CMTs): Implications for TK1 as a proliferation biomarker. *BMC Veterinary Research*, 10(1), 1–12.

Jeffrey C. Philibert, Paul W. Snyder, Nita Glickman, Larry T. Glickman, Deborah W. Knapp, A., & Waters, D. J. (2003). Influence of Host Factors on Survival in Dogs with Malignant Mammary Gland Tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17, 102–106.

Johnston. (1998). *Manual de Cirurgia de Pequenos Animais*. 2^a ed, p. 2566-2591.

Juntas, P., & Pogačnik, M. (2000). Morphometric analysis of AgNORs in tubular and papillary parts of canine mammary gland tumors. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*, 22(3).

Kitchell, S. (2003). *Vet Clin North Am Small Animal Practice*.

Kabel, A. M. (2017). Tumor markers of breast cancer: New perspectives. *Journal of Oncological Sciences*, 3(1), 5–11.

Kabir, F. M. L., Delnnocentes, P., Agarwal, P., Mill, C. P., Riese, D. J., & Bird, R. C. (2017). Estrogen receptor- α , progesterone receptor, and c-erb B/HER-family receptor mRNA detection and phenotype analysis in spontaneous canine models of breast cancer. *Journal of Veterinary Science*, 18(2), 149.

Kim, H.-W., Lim, H.-Y., Shin, J.-I., Seung, B.-J., Ju, J.-H., & Sur, J.-H. (2016). Breed- and age-related differences in canine mammary tumors. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 80(2), 146–155.

Klopfleisch, R., Klose, P., Weise, C., Bondzio, A., Multhaup, G., Einspanier, R., & Gruber, A. D. (2010). Proteome of Metastatic Canine Mammary Carcinomas: Similarities to and Differences from Human Breast Cancer research articles, 6380–6391.

Kristiansen, V. M., Peña, L., Díez Córdova, L., Illera, J. C., Skjerve, E., Breen, A. M., ... Sørenmo, K. U. (2016). Effect of Ovariohysterectomy at the Time of Tumor Removal in Dogs with Mammary Carcinomas: A Randomized Controlled Trial. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30(1), 230–241.

Kumaraguruparan, R., Prathiba, D., & Nagini, S. (2006). Of humans and canines: Immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours. *Research in Veterinary Science*, 81(2), 218–224.

Kwon, S.-C., Yoo, D.-Y., Ko, M., Lee, K.-Y., Kwak, H.-H., Park, I.-C., ... Chung, J.-Y. (2017). Mammary gland tumors in a male Cocker Spaniel. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 59(1),

20.

Moe, L. (2001). Population-based incidence of mammary tumours in some dog breeds. *J Reprod Fertil Suppl.*, 57, 439–43.

Lascelles, D. & Dobson, J. (2003). BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology. p. 300-305.

Lascelles, D. & Dobson, J. (2014). *Manual de Oncología en Pequeños Animales* (3ª Edición). p. 29-41; 351-360.

Lim, H. Y., Im, K. S., Kim, N. H., Kim, H. W., Shin, J. I., & Sur, J. H. (2015). Obesity, expression of adipocytokines, and macrophage infiltration in canine mammary tumors. *Veterinary Journal*, 203(3), 326–331.

Lim, H. Y., Im, K. S., Kim, N. H., Kim, H. W., Shin, J. I., Yhee, J. Y., & Sur, J. H. (2015). Effects of Obesity and Obesity-Related Molecules on Canine Mammary Gland Tumors. *Veterinary Pathology*, 52(6), 1045–1051.

Mafalda, R., & Oliveira, M. D. E. (2009). Neoplasias mamárias em cadelas e gatas. *Faculdade de Medicina Veterinária Faculdade de Medicina Veterinária*.

Malatesta, F. (2015). *Perfil da neoplasia mamária canina e sua relação com a poluição atmosférica Perfil da neoplasia mamária canina e sua relação com a poluição atmosférica*. Faculdade de Medicina da Universidade de S. Paulo.

Manuali, E., De Giuseppe, A., Feliziani, F., Forti, K., Casciari, C., Marchesi, M., ... Król, M. (2012). CA 15–3 cell lines and tissue expression in canine mammary cancer and the correlation between serum levels and tumour histological grade. *BMC Veterinary Research*, 8(1), 86.

Marconato, L., Romanelli, G., Stefanello, D., Giacoboni, C., Bonfanti, U., Bettini, G., ... Zini, E. (2009). Prognostic factors for dogs with mammary inflammatory carcinoma: 43 cases (2003–2008). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 235(8), 967–972.

Matos, A. J. F., Baptista, C. S., Gärtner, M. F., & Rutteman, G. R. (2012). Prognostic studies of canine and feline mammary tumours: The need for standardized procedures. *Veterinary Journal*, 193(1), 24–31.

Merlo, D. F., Rossi, L., Pellegrino, C., Ceppi, M., Cardellino, U., Capurro, C., ... Bocchini, V. (2008). Cancer Incidence in Pet Dogs : Findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy, 976–984.

Meuten, D. J. (2002). *Tumors in Domestic Animals*. p. 575-606.

Misdrop, W., Else, R. W., Hellmén, E., & Lipscomb, T. P. (1999). *Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. (WHO international histological classification of tumors of domestic animals)*, p. 18-27.

Morais CSD, Affonso PRAM, Bitencourt JA, W. A. (2017). Cytogenetic aspects of a canine breast carcinosarcoma - a case report. *Genetics Molecular Research*, 16.

Muhammadnejad, A., Keyhani, E., Mortazavi, P., Behjati, F., & Haghdoost, I. S. (2012). Overexpression of HER-2/neu in Malignant Mammary Tumors: Translation of Clinicopathological

Features from Dog to Human. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(12), 6415–6421.

Nguyen, F., Peña, L., Ibisch, C., Loussouarn, D., Gama, A., Rieder, N., ... Abadie, J. (2017). Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 1: natural history and prognostic factors. *Breast Cancer Research and Treatment*, 1–14.

Nowak, M., Madej, J. A., Pula, B., Dziegiel, P., & Ciaputa, R. (2016). Expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2), E-cadherin and Ki-67 in metastatic and non-metastatic canine mammary carcinomas. *Irish Veterinary Journal*, 69(1), 1–6.

Oliveira, T. F., Maués, T., Ramundo, M. S., Figueiredo, A. M. S., de Mello, M. F. V., El-Jaick, K. B., Ferreira, A. M. R. (2017). TP53 gene expression levels and tumor aggressiveness in canine mammary carcinomas. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 29(6), 865–868.

Pandey, M., Kumar, B. V. S., & Verma, R. (2015). Mammaglobin as a diagnostic serum marker of complex canine mammary carcinomas. *Research in Veterinary Science*, 103, 187–192.

Peña, L., De Andrés, P. J., Clemente, M., Cuesta, P., & Pérez-Alenza, M. D. (2013). Prognostic Value of Histological Grading in Noninflammatory Canine Mammary Carcinomas in a Prospective Study With Two-Year Follow-Up: Relationship With Clinical and Histological Characteristics. *Veterinary Pathology*, 50(1), 94–105.

Peña, L. L., Nieto, A. I., Pérez-Alenza, D., Cuesta, P., & Castaño, M. (1998). Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: Relationship to clinical and pathologic variables. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 10(3), 237–246.

Pérez-Alenza, M. D., Rutteman, G., Peña, L., & Cuesta, P. L. (1998). Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 12, 132–139.

Perez Alenza, M. D., Peña, L., del Castillo, N., & Nieto, a I. (2000). Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *The Journal of Small Animal Practice*, 41(7), 287–291.

Philibert, J. C., Snyder, P. W., Glickman, N., Glickman, L. T., Knapp, D. W., & Waters, D. J. (2003). Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 17(1), 102–6.

Portela, D. A., Romano, M., & Briganti, A. (2014). Retrospective clinical evaluation of ultrasound guided transverse abdominis plane block in dogs undergoing mastectomy. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 41(3), 319–324.

Qiu, H. B., Sun, W. D., Yang, X., Jiang, Q. Y., Chen, S., & Lin, D. G. (2015). Promoter mutation and reduced expression of BRCA1 in canine mammary tumors. *Research in Veterinary Science*, 103, 143–148.

Raposo, T. P., Pires, I., Prada, J., Queiroga, F. L., & Argyle, D. J. (2017). Exploring new biomarkers in the tumour microenvironment of canine inflammatory mammary tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, 15(2), 655–666.

Rasotto, R., Berlato, D., Goldschmidt, M. H., & Zappulli, V. (2017). Prognostic Significance of Canine Mammary Tumor Histologic Subtypes: An Observational Cohort Study of 229 Cases. *Veterinary Pathology*, 54(4), 571–578.

Rasotto, R., Zappulli, V., Castagnaro, M., & Goldschmidt, M. H. (2012). A Retrospective Study of Those Histopathologic Parameters Predictive of Invasion of the Lymphatic System by Canine Mammary Carcinomas. *Veterinary Pathology*, 49(2), 330–340.

Ressel, L., Puleio, R., Loria, G. R., Vannozzi, I., Millanta, F., Caracappa, S., & Poli, A. (2013). HER-2 expression in canine morphologically normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissues and its correlation with the clinical outcome. *Research in Veterinary Science*, 94(2), 299–305.

Salas, Y., Márquez, A., Diaz, D., & Romero, L. (2015). Epidemiological study of mammary tumors in female dogs diagnosed during the period 2002-2012: A growing animal health problem. *PLoS ONE*, 10(5), 1–15.

Sánchez-Céspedes, R., Millán, Y., Guil-Luna, S., Reymundo, C., Espinosa de los Monteros, A., & Martín de las Mulas, J. (2016). Myoepithelial cells in canine mammary tumours. *Veterinary Journal*, 207, 45–52.

Santos, A. A., Lopes, C. C., Ribeiro, J. R., Martins, L. R., Santos, J. C., Amorim, I. F., ... Matos, A. J. (2013). Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: A multivariable survival study. *BMC Veterinary Research*, 9, 1–11.

Santos, M., Correia-Gomes, C., Marcos, R., Santos, A., De Matos, A., Lopes, C., & Dias-Pereira, P. (2015a). Value of the nottingham histological grading parameters and nottingham prognostic index in canine mammary carcinoma. *Anticancer Research*, 35(7), 4219–4228.

Santos, M., Correia-Gomes, C., Santos, A., de Matos, A., Dias-Pereira, P., & Lopes, C. (2015b). Interobserver Reproducibility of Histological Grading of Canine Simple Mammary Carcinomas. *Journal of Comparative Pathology*, 153(1).

Santos, M., Correia-Gomes, C., Santos, A., de Matos, A., Rocha, E., Lopes, C., & Pereira, P. D. (2014). Nuclear pleomorphism: Role in grading and prognosis of canine mammary carcinomas. *Veterinary Journal*, 200(3), 426–433.

Soler, M., Dominguez, E., Lucas, X., Novellas, R., Gomes-Coelho, K. V., Espada, Y., & Agut, A. (2016). Comparison between ultrasonographic findings of benign and malignant canine mammary gland tumours using B-mode, colour Doppler, power Doppler and spectral Doppler. *Research in Veterinary Science*, 107, 141–146.

Sugiura, T., Matsuyama, S., Akiyosi, H., Takenaka, S., Yamate, J., Kuwamura, M., ... Kubo, K. (2007). Expression patterns of the BRCA1 splicing variants in canine normal tissues and mammary gland tumors. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 69, 587–592.

Sun, W., Yang, X., Qiu, H., Zhang, D., Wang, H., Huang, J., & Lin, D. (2015). Relationship between three novel SNPs of BRCA1 and canine mammary tumors. *Journal of Veterinary Medical Science*, 77(11), 1541–1543.

Tavasoly, A., Golshahi, H., Rezaie, A., & Farhadi, M. (2013). Classification and grading of canine malignant mammary tumors. *Veterinary Research Forum*, 4(1), 25–30.

Tiller, L., Francis, W., (2015). *Blackwell's Five-Minutes Veterinary Consult - Canine and Feline* (Sixth). p. 842, 843.

Trere, D., Flagstad, A., Jensen, A. L., & Hellme, E. (2008). Correlation between the Histopathological Diagnosis by AgNOR Count and AgNOR A rea in Canine Mammary Tumors, 1174–1180.

Valencakova-Agyagosova, A., Frischova, Z., Sevcikova, Z., Hajurka, J., Lepej, J., Szakalova, I., ... Ledecy, V. (2014). Determination of carcinoembryonic antigen and cancer antigen (CA 15-3) in bitches with tumours on mammary gland: Preliminary report. *Veterinary and Comparative Oncology*, 12(3), 205–214.

Vilhegas, S., Cassu, R. N., Barbero, R. C., Crociolli, G. C., Rocha, T. L. A., & Gomes, D. R. (2015). Botulinum toxin type A as an adjunct in postoperative pain management in dogs undergoing radical mastectomy. *Veterinary Record*, 177(15), 391.

Withrow, S., & Vail, S. (2007). *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. p. 619-636.

Withrow, S., & MacEwen, E. (2013). *Small Animal. Clinical Oncology*. p.17,18,78,53, 57,118,119, 261,538, 539,541-578.

Zacchetti, A., Van Garderen, E., Teske, E., Nederbragt, H., Dierendonck, J. H., & Rutteman, G. R. (2003). Validation of the use of proliferation markers in canine neoplastic and non-neoplastic tissues: Comparison of KI-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression versus in vivo bromodeoxyuridine labelling by immunohistochemistry. *Apmis*, 111(3), 430–438.