



UNIVERSIDADE DO VALE DO TAQUARI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

EXPRESSÃO DO GENE *ESR1* EM TUMORES DE MAMA CANINO

Daniela Markus Götze

Lajeado/RS, dezembro de 2023

Daniela Markus Götze

EXPRESSÃO DO GENE *ESR1* EM TUMORES DE MAMA CANINO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biotecnologia, da Universidade do Vale do Taquari – Univates, como parte da exigência para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Ivan Cunha Bustamante Filho

Coorientadora: Dr^a. Verônica Contini

Lajeado/RS, dezembro de 2023

Daniela Markus Götze

EXPRESSÃO DO GENE *ESR1* EM TUMORES DE MAMA CANINO

A banca examinadora abaixo aprova a Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia , da Universidade do Vale do Taquari – Univates, como parte da exigência para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, na área de concentração Biotecnologia em Saúde.

Dr. Ivan Cunha Bustamante Filho

Universidade do Vale do Taquari - Univates

Dr^a. Verônica Contini

Universidade do Vale do Taquari – Univates

Dr^a. Fernanda Majolo

Universidade do Vale do Taquari – Univates

Dr^a. Cristina Gewehr Fernandes

Universidade Federal de Pelotas – UFPel

Dr. Marcelo Rezende Luz

Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

Lajeado/RS, dezembro de 2023

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo o incentivo, principalmente ao meu marido, meu parceiro de vida, profissão e de pesquisa e aos meus filhos por todo amor e compreensão. Sem o apoio de vocês eu jamais teria conseguido.

A toda nossa equipe do CenterVet de Teutônia pelo auxílio nas cirurgias, anestésias, exames de sangue e de imagem e principalmente pelo comprometimento com esse projeto de pesquisa.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ivan e coorientadora Prof. Dra. Verônica pela oportunidade e confiança. Obrigado por todos os ensinamentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O câncer é a causa mais comum de morte em cães em todo o mundo, sendo que os tumores mamários constituem a neoplasia mais frequente em fêmeas caninas. Esses tumores são caracterizados por uma apresentação clínica, comportamento biológico e características morfológicas e moleculares variáveis. Dentre os fatores envolvidos em sua patogênese está a exposição ao estrógeno e a ação de seu receptor. O receptor de estrógeno- α (RE α) é uma proteína, codificada pelo gene *ESR1*, amplamente utilizada como marcador molecular de prognóstico para o câncer de mama em mulheres, porém na cadela ainda é pouco utilizado. Neste trabalho, foi avaliada a expressão do gene *ESR1* por qPCR em amostras de mama normal, lesões epiteliais não neoplásicas, tumores mamários benignos e malignos. Além disso, fez-se acompanhamento desses animais por um período de 2 anos, avaliando a sobrevida global e a sobrevida livre de doença. Neste estudo foram utilizadas biópsias de 21 cadelas com tumores mamários. No estudo histopatológico foram identificadas 90 lesões, sendo 19 lesões epiteliais não neoplásicas, 2 tumores benignos e 69 tumores malignos. Foi encontrado um maior número de lesões em animais com mais idade ($p < 0,05$). Animais castrados juntamente com a mastectomia apresentaram uma sobrevida maior do que animais inteiros ($p < 0,05$). Observou-se uma menor expressão do gene *ESR1* ($p < 0,05$) nos tumores malignos em relação às mamas normais, lesões epiteliais não neoplásicas e aos tumores benignos. Além disso, verificou-se uma maior expressão em carcinomas de bom prognóstico comparado aos carcinomas do tipo especial ($p < 0,05$). Sendo assim, sugere-se a utilização do gene *ESR1* como biomarcador de bom prognóstico em cadelas com lesões mamárias.

PALAVRAS-CHAVE: Tumor de mama em cadelas, *ESR1*, glândula mamária, prognóstico, expressão gênica.

ABSTRACT

Cancer is the most common cause of death in dogs worldwide and mammary tumors is the most common neoplasm in female dogs. These tumors are characterized by variable clinical presentation, biological behavior, morphological and molecular characteristics. Among the factors involved in its pathogenesis is exposure to estrogen and the action of its receptor. The estrogen receptor- α (ER α) is a protein, encoded by the *ESR1* gene, widely used as a molecular prognostic marker for breast cancer in women, but it is not used frequently in dogs. In this work, the expression of the *ESR1* gene was evaluated by RT-qPCR in samples from normal breast, non-neoplastic epithelial lesions, benign and malignant mammary tumors. Furthermore, these animals were monitored for a period of 2 years, evaluating overall survival and disease-free survival. In this study, biopsies from 21 dogs with mammary tumors were used. In the histopathological study, 90 lesions were identified, 19 non-neoplastic epithelial lesions, 2 benign tumors and 69 malignant tumors. A greater number of lesions were found in older animals ($p < 0.05$). Animals spayed on the same day that mastectomy had a higher survival rate than intact animals. A lower expression of the *ESR1* gene ($p < 0.05$) was observed in malignant tumors compared to normal tissue, non-neoplastic epithelial lesions and benign tumors. Furthermore, there was a higher expression in carcinomas with a good prognosis compared to special types of carcinomas ($p < 0.05$). Therefore, it is suggested to use the *ESR1* gene as a biomarker of good prognosis in female dogs with mammary lesions.

KEYWORDS: Canine mammary tumor, *ESR1*, mammary gland, prognostic, gene expression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1- Eventos característicos do câncer.	15
Figura 2 - Etapas de formação do carcinoma invasivo.....	17
Figura 3 - Distribuição das glândulas mamárias	18
Figura 4 - Curva de Kaplan-Meier mostrando a sobrevida global das cadelas comparado ao status reprodutivo. Acompanhamento durante 2 anos (720 dias).....	32
Figura 5 - Exame radiográfico do tórax de fêmea canina evidenciando o surgimento de metástase em parênquima pulmonar.....	32
Figura 6 - Curva de Kaplan-Meier mostrando a sobrevida livre de doença comparada ao status reprodutivo. Acompanhamento durante 2 anos (720 dias).....	33
Figura 7 - Quantificação da expressão do gene <i>ESR1</i> nos diferentes tecidos tumorais	34
Figura 8 - Quantificação da expressão do gene <i>ESR1</i> nos diferentes tecidos tumorais correlacionando tecido sadio, carcinomas simples (Carcinoma sólido, papilar e tubular) e carcinomas complexos (Carcinoma em tumor misto e carcinossarcoma).....	34
Figura 9 - Quantificação da expressão do gene <i>ESR1</i> em carcinomas do tipo especial e carcinomas de bom prognóstico	35

LISTAS DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação histológica dos tumores mamários caninos.....	21
Quadro 2 - Guideline para determinar a técnica cirúrgica e extensão para tumores únicos mamários, dependendo da localização.	26

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Estadiamento clínico para tumores mamários caninos de acordo com o sistema TNM	20
---	----

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 - Certificado de aprovação no CEUA	52
Anexo 2 - Termo de Consentimento livre e esclarecido - TCLE.	54
Anexo 3 - Ficha de avaliação oncológica.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cDNA: DNA complementar

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EGFR: Receptor do fator de crescimento epidérmico

ESR1 Receptor de estrogênio 1

E2: Estradiol

HER-2: Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2

IPB: Instituto Pet Brasil

M1: Mama torácica cranial

M2: Mama torácica caudal

M3: Mama abdominal cranial

M4: Mama abdominal caudal

M5: Mama inguinal

OMS: Organização Mundial da Saúde

OSH: Ovariossalpingohisterectomia

pb: Par de base

PIB: Produto interno bruto

PI3KCA: Phosphoinositide-3-kinase

RE: Receptor de estrógeno

RE α : Receptor de estrógeno alfa

PR: Receptor de progesterona

RNA: Ácido ribonucleico

PCR: Reação em cadeia da polimerase

P53: Proteína 53

RT-qPCR: PCR quantitativo em tempo real

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único

T1: Tumores menos que 3 cm

T2: Tumores com tamanho entre 3 e 5 cm

T3: Tumores maiores que 5 cm

TN: Triplo Negativo

TNM: Sistema de classificação por tamanho do tumor primário (T), linfonodo regionais (N), metástase à distância (M)

TMC: Tumor de mama canino

TMH: Tumor de mama humano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
1.2 Objetivos	12
1.2.1 Objetivo geral.....	12
1.2.2 Objetivos específicos	12
1.3 Justificativa.....	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1 O câncer.....	14
2.1.2 Iniciação e incidência do câncer de mama.....	15
2.1.3 Aspectos anatômicos da glândula mamária canina.....	17
2.1.4 Diagnóstico e estadiamento	19
2.1.5 Classificação histológica dos tumores mamários e tratamento.....	20
2.2 Receptor de estrógeno	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1 Tipo de pesquisa e materiais	25
3.2 Aspectos éticos.....	26
3.3 Coleta de dados	26
3.3.1 Avaliação hematológica.....	27

3.3.2 Pesquisa de metástases.....	27
3.3.4 Acompanhamento do estudo.....	28
3.4 Avaliação da expressão do gene <i>ESRI</i>	28
3.4.1 Extração de RNA e síntese do cDNA.....	28
3.4.2 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (PCR).....	28
3.5 Análise de dados.....	29
4 RESULTADOS.....	30
4.1 Clínico-patológicos.....	30
4.2 Níveis de expressão do gene <i>ESRI</i>	33
5 DISCUSSÃO.....	36
6 CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS.....	42
ANEXOS.....	52

1 INTRODUÇÃO

O câncer é a causa mais comum de morte em cães em todo o mundo (GARDNER *et al.*, 2016; SHIFFMANN; BREEN, 2015). Uma gama diversificada de neoplasmas são observadas na espécie canina, e o tumor de mama canino (TMC) é o tumor mais frequente encontrado em cadelas e representa uma importante doença na medicina veterinária (CHOI *et al.*, 2016, SIEGEL *et al.*, 2019; MOE, 2001; GILBERTSON *et al.*, 1983, CASSALI *et al.*, 2009). A carcinogênese é um processo sequencial que envolve uma diversidade de mudanças genéticas e epigenéticas, que acabam por afetar a expressão gênica, levando ao desenvolvimento das neoplasias (BAYLIN *et al.*, 2000). Embora a carcinogênese mamária não esteja completamente elucidada, sabe-se que o estrógeno e progesterona exercem importante papel na iniciação e progressão deste tumor (DONNAY *et al.*, 1995; SORENMO *et al.*, 2011). Esse papel se deve em grande parte à ligação do hormônio com seu receptor. No caso do receptor de estrógeno α (RE α), sua ativação leva à estimulação de diversos fatores de transcrição que irão atuar na regulação de genes responsivos ao estrógeno, muitos deles responsáveis pelo crescimento tumoral (KRÓLIK; MILNEROWICZ, 2012).

Devido à sua importância na progressão tumoral, o RE α , juntamente com o receptor de progesterona (RP) e com o receptor do fator de crescimento epidermal 2 (HER2), compõe o painel imuno-histoquímico diagnóstico e prognóstico do câncer de mama na mulher (SORLIE *et al.*, 2001), além de ser alvo nas terapias hormonais (VINOGRADOVA *et al.*, 2020). Na medicina veterinária a função do RE α como marcador diagnóstico e prognóstico ainda não está bem estabelecida, embora muitos trabalhos tenham encontrado uma menor expressão desta proteína em neoplasias mamárias mais agressivas (PENA *et al.*, 2014).

Desta forma, a presente dissertação propôs, através do estudo de biópsias tumorais e mamas sadias, identificar e quantificar a expressão do gene *ESR1*, associando com as classificações clínicas e histopatológicas, verificando assim, seu potencial como um fator de prognóstico da progressão clínica da doença.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

O presente estudo teve por objetivo avaliar a expressão do gene *ESR1* em cadelas com tumor de mama como biomarcador de prognóstico.

1.2.2 Objetivos específicos

- I. Caracterizar os dados clínico-patológicos dos pacientes incluídos no estudo às associações histopatológicas.
- II. Avaliar a expressão do gene *ESR1* em tumores de mama malignos, benignos, lesões epiteliais não neoplásicas e mamas sadias.
- III. Comparar a expressão do gene *ESR1* entre neoplasia malignas.
- IV. Identificar se há relação do tamanho do tumor com a expressão do gene *ESR1*.

1.3 Justificativa

O mercado pet cresce cerca de 3,5% ao ano no mundo. Na última década, as grandes potências dessa expansão vêm sendo os países em desenvolvimento, como o Brasil e a China. No Brasil, de 2006 para 2019, o faturamento da indústria de produtos para animais de estimação passou de R\$ 3,3 bilhões para R\$ 22,3 bilhões (INSTITUTO PETBRASIL, 2020). Esses valores englobam a movimentação das indústrias e das empresas que fazem parte da cadeia de distribuição dos segmentos de alimentos, medicamentos veterinários e cuidados com saúde e higiene dos pets. Em 2019, o setor pet representou em 0,30% do PIB nacional, sendo responsável por uma fatia maior do que outros setores relevantes, como o de automação industrial (0,08%). Mais do que “apenas” representativo e volumoso, o setor de produtos para animais de estimação é um setor essencial, que está intimamente ligado à vida dos brasileiros. Ele é fundamental para garantir, além do bem-estar dos cães, ainda manter o funcionamento de

uma cadeia produtiva complexa e estruturada tais como de alimentos, remédios e serviços . Estimativa do Instituto Pet Brasil (IPB) indica que a população pet brasileira atingiu aproximadamente 139,3 milhões de animais em 2018. São 54,2 milhões de cães; 39,8 milhões de aves; 23,9 milhões de gatos; 19,1 milhões de peixes e 2,3 milhões de répteis e pequenos mamíferos. Em 2013, a população pet no Brasil era de cerca de 132,4 milhões de animais (IBGE, 2013). O censo pet no Brasil é realizado a cada 10 anos, sendo o próximo previsto para o ano de 2023.

A importância dos TMC tem aumentado devido à frequência com que casos de neoplasia surgem na clínica dos animais de companhia e às semelhanças que têm com os tumores de mama na mulher. Atualmente, estima-se que a cada ano, cerca de 6 entre 70 milhões de cães nos EUA desenvolvem câncer (CENTER FOR CANCER RESEARCH, 2019). Para cães de estimação, tanto a expectativa de vida quanto a incidência de câncer variam entre as raças e os países (KENT *et al.*, 2018). Como esperado, o risco aumenta com a idade, visto que 50% dos cães com 10 anos ou mais morrem devido a diferentes tipos de neoplasias (MERLO *et al.*, 2008).

A cada dia tem crescido o número de tutores preocupados com a prevenção de doenças nos pets e não somente com o tratamento da doença. Mostrando ser um reflexo do modo de criação dos animais dentro de casa, dividindo o mesmo espaço social das famílias. Em muitos lares o cão é criado como um membro da família o qual necessita de exames periódicos como nos humanos.

Entretanto, o tumor de mama na veterinária ainda é diagnosticado tardiamente, levando a um pior prognóstico, podendo inclusive ser necessário um número maior de procedimentos como cirurgias, por necessidade da remoção de mais glândulas comprometidas e aumentando os gastos por parte dos tutores desses animais. Devido a elevada incidência do câncer de mama em caninos as pesquisas acerca desse tema vêm crescendo em relação a outras afecções, bem como a exigência por parte dos tutores de que seus animais recebam atenção e tratamentos semelhantes aos prestados a pacientes humanos (DALECK *et al.*, 2008).

Além disso, outro viés muito importante que justifique a relevância deste trabalho é que tumores de ocorrência natural em animais são excelentes modelos de câncer humano devido às suas características genéticas e patológicas semelhantes. Como parte da iniciativa One Health, a oncologia comparativa é uma área de pesquisa importante para novas descobertas diagnósticas e terapêuticas tanto para humanos e animais (DAVIS; OSTRANDER, 2014).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O câncer

Envolvendo dinâmicas mudanças no genoma, o câncer é uma classe de doenças que pode se desenvolver em qualquer tecido do corpo. O surgimento do neoplasma é o resultado de alterações genéticas e epigenéticas que influenciam no controle e atividade de diversos genes, especialmente os envolvidos nos processos de diferenciação, crescimento e apoptose, promovendo uma proliferação celular anormal e desordenada (LEVITT; HICKSON, 2002; VOGELSTEIN; KINZLER, 2004; SADIKOVIC *et al.*, 2008; ALI; SJÖBLOM, 2009).

Alterações em oncogenes, genes supressores de tumor e genes de reparo de DNA podem levar a defeitos nos processos biológicos regulatórios que controlam a proliferação celular e a homeostase, culminando no desenvolvimento tumoral. O câncer, no entanto, não é apenas uma massa de células em proliferação, mas sim um tecido complexo e heterogêneo, composto por vários tipos celulares que interagem entre si participando da iniciação e progressão tumoral, bem como do desenvolvimento de metástases (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Esta heterogeneidade contribui para que o mesmo tipo tumoral possua comportamentos clínicos distintos referentes ao tratamento e manejo da doença (CROCE *et al.*, 2008).

HANAHAN e WEINBERG (2000) enumeraram uma série de eventos que participam da iniciação e desenvolvimento do câncer (FIGURA 1). Esses eventos incluem: autossuficiência em sinais de proliferação celular, insensibilidade aos sinais antiproliferativos, evasão à apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, invasão tecidual e metástase, instabilidade genômica, promoção de inflamação, desregulação energética metabólica e evasão a destruição imunológica.



Figura 1- Eventos característicos do câncer. Fonte: Adaptado Hanahan; Weinberg (2011).

2.1.2 Iniciação e incidência do câncer de mama

O câncer de mama é o de maior incidência tanto nas mulheres adultas quanto em fêmeas caninas não castradas (SIEGER *et al.*, 2016; SORENMO *et al.*, 2011). Segundo Jemal *et al* (2011) é a neoplasia de maior prevalência e a principal causa de morbidade e mortalidade entre mulheres do mundo todo. Este tumor acomete mulheres de meia idade (50-64 anos) e fatores como uso de terapias hormonais, idade a menarca e menopausa, quantidade de gestações, dieta, bem como hereditariedade, podem predispor ao desenvolvimento neoplásico nas mamas (MCPHERSON *et al.*, 2000). Foi estimado que o câncer de mama no Brasil representa 28,1% dos cânceres diagnosticados em mulheres (INCA, 2016).

Não existe estudo nacional semelhante para o câncer em cadelas, entretanto em estudo retrospectivo de 19 anos conduzido na Universidade Federal de Santa Maria, o câncer de mama em cadelas teve uma prevalência anual de 36,3% a 49,2% (OLIVEIRA-FILHO *et al.*, 2010). A literatura internacional também relata elevada incidência de tumores mamários caninos (SALAS *et al.*, 2015; VASCELLARI *et al.*, 2016). Choi *et al.*, 2016 identificou as neoplasias mamárias caninas como sendo o principal tipo de neoplasma correspondendo a aproximadamente 52% dos tumores que ocorrem em fêmeas na espécie canina (VASCELLARI *et al.*, 2016).

Nas mulheres, os estrogênios desempenham um papel fundamental no desenvolvimento dos ductos mamários na puberdade, durante o ciclo menstrual e também durante a gravidez

(HILTON *et al.*, 2018; MACIAS; HINCK, 2012; ARENDR; KUPERWASEER, 2015; STINGL, 2011; STERNLICHT *et al.*, 2006). Eles também atuam no desenvolvimento e progressão do câncer de mama devido às suas propriedades pró-proliferativas e anti-apoptóticas (PARL *et al.*, 2009; SANTEN *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2013).

Em fêmeas caninas, a etiopatogenia do câncer é multifatorial, depende da interação de múltiplos genes e fatores ambientais, dessa forma, acredita-se que o aumento progressivo da expectativa de vida dos animais aumente a probabilidade de alterações acumularem-se no material genético predispondo o acometimento de neoplasias (SORENMO *et al.*, 2011). Sabe-se que os receptores de estrógeno e progesterona estão intimamente envolvidos no mecanismo da formação de tumores mamários, uma vez que estimulam a proliferação do epitélio, ocorrendo aumento na possibilidade de ocorrência de mutações (PENÃ *et al.*, 2014).

Tanto na mulher quanto na cadela a massa tumoral pode se originar dos tipos celulares que compõe o sistema ducto-lobular da glândula mamária, ou seja, pode ter origem no epitélio luminal dos ductos ou dos alvéolos e/ou nas células mioepiteliais que os circundam (FIGURA 2). A metaplasia óssea e/ou condroide é comumente observada nos tumores mamários caninos e pouco frequente nas mulheres (PENÃ *et al.*, 2014; WEIGELT; REIS-FILHO, 2014). Essas alterações no perfil molecular do epitélio mamário sugerem que lesões intraepiteliais ou intraductais (hiperplasia ductal e lobular e carcinoma ductal in situ) representam estágio evolutivos no processo de progressão neoplásica maligna (FERREIRA *et al.*, 2010; 2012).

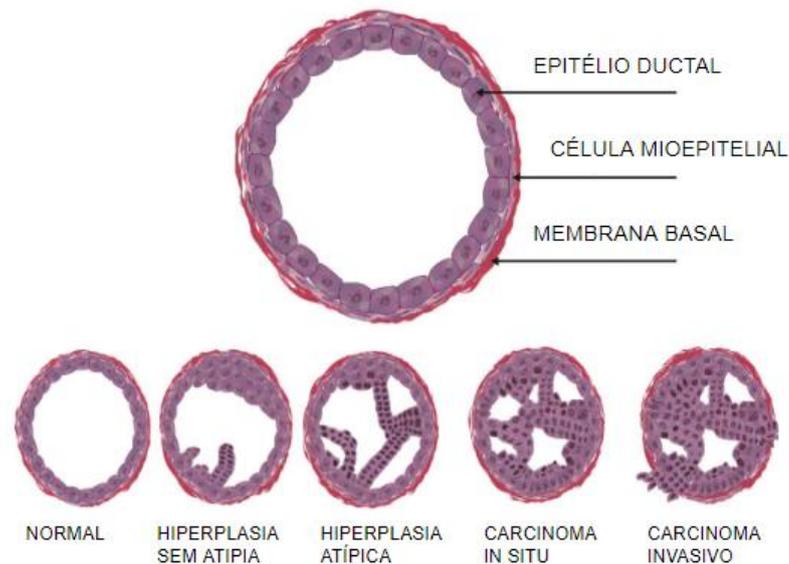


Figura 2 - Etapas de formação do carcinoma invasivo. A figura representa um ducto normal, composto pelo epitélio luminal delimitado pelas células mioepiteliais e membrana basal. Na parte inferior da imagem observa-se uma formação hiperplásica em direção ao centro do ducto, passando a apresentar atipia celular. Num próximo estágio o aumento da atipia celular e da proliferação caracterizam o carcinoma in situ, que tem seu crescimento projetado para o centro do ducto. No estágio mais avançado, as células neoplásicas conseguem ultrapassar as células mioepiteliais e a membrana basal, caracterizando um carcinoma invasivo. Fonte: Adaptado de CASSALI *et al.*, (2014).

A obesidade parece desempenhar um papel importante no desenvolvimento de TMC (SORENMO, 2003; SLEECKX *et al.*, 2011; SORENMO *et al.*, 2011). Alguns estudos relatam uma correlação entre obesidade e dietas ricas em gordura e o risco de desenvolver TMC (PEREZ ALENZA *et al.* 2000). Lim e colegas (2015) demonstraram que a proporção de tumores mamários pouco diferenciados foi significativamente maior em cães com sobrepeso ou obesos (LIM *et al.*, 2015). Esses achados podem estar relacionados ao aumento dos níveis de estrogênios livres biodisponíveis resultantes da função prejudicada da globulina de ligação aos hormônios sexuais em cadelas obesas (SORENMO, 2003, SORENMO *et al.*, 2011).

2.1.3 Aspectos anatômicos da glândula mamária canina

A glândula mamária é classificada como glândula apócrina tubuloalveolar composta, consistindo de estroma (tecido conjuntivo), parênquima (porção epitelial), ductos, vasos e nervos. Está presente sob forma de linhas mamárias subepidérmicas, em fases precoces do embrião e, nos animais do sexo feminino, tem desenvolvimento fetal aumentado após o nascimento (FRANDSON, 1979). As glândulas mamárias distribuem-se em duas cadeias (FIGURA 3) e a sua nomenclatura (M1, M2, M3, M4 e M5) é atribuída de acordo com a sua localização. Na cadela, se identificam geralmente cinco pares de glândulas: dois pares torácicos

(craniais e caudais); dois pares abdominais (craniais e caudais) e um par inguinal (FELICIANO *et al.*, 2012).



Figura 3 - Distribuição das glândulas mamárias. (A) Fêmeas canina em decúbito dorsal com a nomenclatura das glândulas mamárias conforme sua localização. (B) Medição do neoplasma. Fonte: do autor (2022).

As glândulas mamárias diferenciam-se durante os sucessivos estágios de vida do animal (KOLB, 1987). Na fêmea que não atingiu a puberdade é formada por um sistema tubular ramificado rudimentar, ligado aos ductos lactíferos. Quando sob o efeito dos estrógenos (puberdade), o sistema tubular se desenvolve, com discreto aumento de células adiposas. Portanto, o volume externo da mama aumenta ligeiramente, o que acontece, sobretudo nas abdominais caudais e inguinais. Os esteróides atuam significativamente sobre as glândulas da cadela, e o tipo de ciclo estral destes animais determina uma ação prolongada durante o estro, que retorna ao seu nível basal cerca de 80 a 100 dias após o início do estro.

Dessa forma, as glândulas mamárias se diferenciam, evoluem e involuem repetidamente a cada ciclo estral. Assim sendo, modificações organizacionais do tecido glandular, apesar de fisiológicas, podem levar ao desenvolvimento, em qualquer local desse tecido, mas especialmente na região epitelial, de alterações neoplásicas diversas (ZUCCARI *et al.*, 2001).

2.1.4 Diagnóstico e estadiamento

Os TMC geralmente se apresentam como nódulos circunscritos de dimensões variáveis, consistentes, móveis ou aderidos a musculatura, a ulceração cutânea e inflamação periférica podem ou não estar associadas. Frequentemente, múltiplos tumores podem ser observados em uma única glândula mamária ou podem envolver simultaneamente mais de uma glândula mamária com diferentes tipos histológicos.

O processo de diagnóstico do câncer de mama da cadela inicia com uma anamnese e exame físico completos, seguidos pelo estadiamento da neoplasia mamária através do sistema TNM, originalmente proposto pela Organização Mundial da Saúde (OWEN, 1980) e posteriormente adaptado (SORENMO *et al.*, 2013). O sistema TNM (TABELA 1) é baseado no tamanho da neoplasia (T1<3 cm; T2= 3- 5 cm; T3 > 5 cm), à formação de metástases, podendo ser classificadas em regional, nos linfonodos regionais (N0- sem metástase; N1- presença de metástase) ou à distância, ocorrendo por via linfática ou hematogena (M0 – sem metástase; M1 presença de metástase) (OWEN, 1980; Cassali *et al.*, 2011, 2014, 2020) .

A formação de metástases à distância pode ocorrer primeiramente no pulmão, posteriormente em linfonodos cervicais superficiais, esternais ou inguinais profundos e/ou em tecido hepático, renal e, menos frequentemente, ósseo, cardíaco ou pele (LANA *et al.*, 2007). A drenagem linfática dos tumores mamários caninos é complexa, tendo sido demonstrada a existência de comunicações linfáticas entre a cadeia mamária direita e a cadeia mamária esquerda e entre glândulas adjacentes de uma mesma cadeia; esta distribuição contribui para a ocorrência de metástases (FELICIANO *et al.*, 2008).

A avaliação de metástases em linfonodos regionais é determinada por meio da avaliação citológica (CHOI *et al.*, 2016) ou histopatológica (CASSALI *et al.*, 2014), enquanto as metástases à distância são avaliadas pelos exames de imagem, através do exame ultrassonográfico abdominal e exame radiográfico de tórax em três projeções (lateral direita e esquerda e ventro-dorsal) (THRALL, 2019). Lesões pulmonares inferiores a 6 mm de diâmetro dificilmente são detectadas pelo exame de raio-x, sendo indicada a avaliação pela tomografia computadorizada para diagnóstico precoce (SORENMO, 2003; CASSALI *et al.*, 2020).

Tabela 1 - Estadiamento clínico para tumores mamários caninos de acordo com o sistema TNM.

T – Tumor Primário	
T1	Diâmetro máximo < 3 cm
T2	Diâmetro máximo 3 – 5 cm
T3	Diâmetro máximo > 5 cm
N – Linfonodo Regional	
N0	Sem metástase
N1	Presença de metástase
M – Metástase a distância	
M0	Sem metástase
M1	Presença de metástase
Estágios	
I	T1 N0 M0
II	T2 N0 M0
III	T3 N0 M0
IV	Qualquer T N1 M0
V	Qualquer T Qualquer N M1

Fonte: OWEN (1980); CASSALI *et al.* (2011; 2014; 2020).

2.1.5 Classificação histológica dos tumores mamários e tratamento

Diversos métodos de classificação histopatológica foram propostos para os tumores mamários caninos e se baseiam na identificação morfológica das células permitindo um diagnóstico preciso em muitas neoplasias (CASSALI *et al.*, 2014). Ao longo dos anos, várias classificações foram propostas, a mais conhecida é a de Misdorp *et al.* (1999) e Goldschmidt *et al.* (2011). No Brasil, a classificação foi atualizada por Cassali *et al.* (2014, 2017, 2020) com o consenso para o diagnóstico, prognóstico e tratamento dos tumores mamários, conforme descrito no Quadro 1.

Quadro 1 - Classificação histológica dos tumores mamários caninos.

<p>1. Lesões epiteliais não neoplásicas</p> <p>1.1 Hiperplasia ductal</p> <p>1.2 Hiperplasia lobular</p> <p>1.3 Adenose</p> <p>1.4 Ectasia de ductos mamários</p> <p>1.5 Lesões de células colunares</p> <p>1.5.1 Alteração de células colunares</p> <p>1.5.2 Hiperplasia de células colunares</p> <p>1.5.3 Lesão de células colunares atípicas</p>
<p>2. Tumores Benignos</p> <p>2.1 Adenoma</p> <p>2.2 Adenomioepitelioma</p> <p>2.3 Mioepitelioma</p> <p>2.4 Adenoma basalóide</p> <p>2.5 Fibroadenoma</p> <p>2.6 Tumor misto benigno</p> <p>2.7 Papiloma ductal</p> <p>2.8 Tumor filoides</p>
<p>3. Tumores malignos</p> <p>3.1 Carcinomas</p> <p>3.1.1. Carcinoma <i>In Situ</i></p> <p>3.1.1.1 Carcinoma ductal <i>In Situ</i></p> <p>3.1.1.2 Carcinoma lobular <i>In Situ</i></p> <p>3.1.2 Carcinoma em tumor misto</p> <p>3.1.3 Carcinoma papilar</p> <p>3.1.4 Carcinoma tubular</p> <p>3.1.5 Carcinoma sólido</p> <p>3.1.6 Carcinoma basalóide</p> <p>3.1.7 Carcinoma cribiforme</p> <p>3.1.8 Tipos especiais de carcinomas</p> <p>3.1.8.1 Carcinoma micropapilar</p> <p>3.1.8.2 Carcinoma lobular pleomórfico</p> <p>3.1.8.3 Carcinoma secretório</p> <p>3.1.8.4 Carcinoma mucinoso</p> <p>3.1.8.5 Carcinoma rico em lipídio</p> <p>3.1.8.6 Carcinoma rico em glicogênio</p> <p>3.1.8.7 Carcinoma de células escamosas</p> <p>3.1.8.8 Carcinoma Cell-spindler</p> <p>3.1.8.9 Carcinoma com diferenciação sebácea</p> <p>3.2 Neoplasias mioepiteliais</p> <p>3.2.1 Adenomioepitelioma maligno</p> <p>3.2.2 Mioepitelioma maligno</p> <p>3.3 Sarcomas</p> <p>3.3.1 Fibrosarcoma</p> <p>3.3.2 Osteosarcoma</p> <p>3.3.3 Carcinosarcoma</p>

- 3.3.4 Sarcoma em tumor misto
- 3.3.5 Outros sarcomas
 - 3.3.5.1 Condrosarcoma
 - 3.3.5.2 Liposarcoma
 - 3.3.5.3 Hemangiosarcoma
 - 3.3.5.4 Sarcoma filóide

Fonte: Modificado por CASSALI *et al.* (2014).

Assim, o diagnóstico preciso, bem como a diferenciação entre neoplasias benignas e malignas, é importante para o sucesso dos protocolos de tratamento (KUMAR *et al.*, 2020). Paralelamente ao exame histopatológico, a técnica de imuno-histoquímica tem se mostrado uma importante ferramenta para a identificação de novos marcadores prognósticos (PENÃ *et al.*, 2014). Esta técnica permite a visualização, por cor, da ligação entre um anticorpo específico e um antígeno presente nas células tumorais (PENÃ *et al.*, 2014).

Na medicina humana existe um painel de marcadores estabelecido para uso no prognóstico clínico de mulheres com câncer de mama (ZAHA *et al.*, 2014). Este painel determina a classificação fenotípica e inclui os receptores de estrogênio e progesterona e HER-2 (ZUCCARI *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2009).

De acordo com a presença ou ausência dessas moléculas nos ensaios de imuno-histoquímica, os tumores mamários em humanos são classificados como: Luminal A, Luminal B, os que superexpressam HER2, os Basal-like ou Triplos Negativos (TN). Os do tipo Basal-like e triplo negativo não apresentam nenhum destes três marcadores e se diferenciam quanto a expressão de citoqueratinas, sendo considerados os tipos mais agressivos de câncer de mama (SORLIE *et al.*, 2001).

Entretanto na medicina veterinária, existem poucos estudos atualmente com foco nessa classificação fenotípica e resultados conflitantes (VARALLO *et al.*, 2019). Tentou-se adaptar este painel imuno-histoquímico para o prognóstico de tumores de mama de cadelas. O anticorpo componente do protocolo HercepTest (DAKO, Glostrup, Dinamarca), por exemplo, que é utilizado para a detecção de HER2 no câncer de mama de mulher, foi testado e mostrou ter reatividade inconstante em tecidos mamários caninos (BAILEY; WESTERLING; BROWN, 2015). Além do seu papel na determinação prognóstica no câncer de mama da mulher, o RE possui grande importância no direcionamento do tratamento. Terapias hormonais são amplamente utilizadas no tratamento de câncer de mama RE positivo da mulher, desta forma as drogas antagonistas de estrogênio, como o tamoxifeno (VINOGRADOVA *et al.*, 2020).

O tratamento de escolha para o tumor de mama canino é a mastectomia, podendo ser associado aos quimioterápicos. A quimioterapia é considerada um tratamento adjuvante para tumores quando a excisão cirúrgica produz resultados insatisfatórios ou em casos de tumores inoperáveis (MARCONATO *et al.*, 2008; LAVALLE *et al.*, 2012; DE CAMPOS *et al.*, 2016). Radioterapia adjuvante e terapia endócrina com antiestrogênicos, como tamoxifeno, não mostraram nenhum benefício em comparação com a cirurgia isolada em cães (NOVOSAD, 2003). Citrato de tamoxifeno é um inibidor seletivo de receptores de estrogênio e exerce um potente efeito anti-estrogênio na glândula mamária impedindo a estimulação de células cancerosas existentes. No entanto, demonstrou efeitos anti estrogênicos e estrogênicos causadores de piometra (TAVARES *et al.*, 2010; SLEECKX *et al.*, 2011).

O benefício da OSH no momento da excisão dos tumores mamários permanece ambíguo. Alguns estudos não defendem vantagens significativas para cães tratados por mastectomia e ovariosterectomizados ao mesmo tempo que as submetidas apenas a mastectomia (SCHNEIDER *et al.*, 1969; MORRIS *et al.*, 1998).

A biologia molecular tem ampliado o conhecimento das alterações genéticas do câncer na veterinária (KUSEWITT, 2013). Através do conhecimento genômico, é possível identificar várias alterações envolvidas na patogênese da doença e também no prognóstico, visto que fornecem informações acerca da origem do processo, presença ou não de receptores (TIMMERMANS-SPRANG *et al.*, 2017).

2.2 Receptor de estrógeno

O RE é uma proteína existente no núcleo de determinadas células, também encontrado em menores proporções na membrana plasmática e no citoplasma (PRESS *et al.*, 1986; RAZANDI *et al.*, 1999). Esse receptor é normalmente encontrado em células do ovário e do endométrio e apresenta elevada afinidade pelo estrógeno (E2), que exerce importante papel fisiológico na maturação dos órgãos reprodutivos femininos e desenvolvimento da glândula mamária. A união dos estrógenos com seu receptor ocorre graças à complementaridade estrutural entre essas moléculas, como em um sistema de chave e fechadura. Essa ligação leva a uma série de reações químicas que culminam com a expressão de certos genes (BOCCHINFUSO; KORACH, 1997; LUBAHN *et al.*, 1993).

O E2 é um hormônio esteroide predominantemente sintetizado pelos folículos ovarianos de mamíferos e secretado no sangue e também é sintetizado periféricamente nas células que expressam a enzima aromatase. Sua natureza lipofílica permite que ele passe livremente através das membranas celulares, acessando células dentro de muitos tecidos. O que permite que o E2 atinja especificamente certas células é seu transdutor, o RE (CUI et al., 2013).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Tipo de pesquisa e materiais

O modo de abordagem da pesquisa classifica-se como quantitativo. Quanto ao objetivo da pesquisa, é um estudo exploratório descritivo que utiliza como procedimento técnico a forma experimental e levantamento de dados de forma longitudinal.

Para este estudo, um total de 90 biópsias de tumores de mama foram coletadas de 21 cadelas de diferentes raças com idades entre 5 e 16 anos com neoplasia mamária. Quatorze glândulas mamárias normais, de sete cadelas de diferentes raças foram utilizadas como controle, pois não apresentavam nenhum nódulo ou tumor nas mamas.

Os animais incluídos no estudo foram casos clínicos oriundos do Centro Clínico Veterinário de Teutônia – CenterVet (Teutônia/RS). Além da coleta de informações, incluindo idade, raça, sexo, escore corporal, histórico de ovariectomia, informações sobre o tamanho do tumor (comprimento máximo).

Para o recrutamento foram realizados exames de imagem (radiologia e ultrassonografia abdominal) e exames hematológicos (hemograma e bioquímico) para averiguar possíveis metástases e outras doenças. Os animais que ingressaram no estudo foram acompanhados no primeiro semestre a cada 2 meses para avaliação clínica e coleta de sangue e exames de imagem, e após a cada 3 meses totalizando o período de 24 meses após a cirurgia, tendo-se desta forma a avaliação da evolução pós-operatória da doença.

3.2 Aspectos éticos

Para participação do experimento, foi solicitado a leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (Anexo 1) aos tutores dos animais selecionados. Os pesquisadores comprometeram-se a não revelar a identidade dos animais e participantes, apenas apresentando os resultados em eventos científicos e de forma generalizada.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Vale do Taquari, sob o número de protocolo 23 (Anexo 2).

3.3 Coleta de dados

Os animais selecionados foram cadastrados em fichas individuais (Anexo 3) para registro do histórico do paciente. Vinte e oito fêmeas caninas, destas sete cadelas identificadas como controle (animais eutanasiados por motivo não experimental), sem tumores mamários, tiveram suas mamas M4 esquerda e direita coletadas e 21 cadelas portadoras de neoplasia mamária foram submetidas ao procedimento cirúrgico de mastectomia, conforme localização da neoplasia e do *Guideline* (QUADRO 2).

Quadro 2 - *Guideline* para determinar a técnica cirúrgica e extensão para tumores únicos mamários, dependendo da localização.

Localização	Tamanho do tumor	Tipo de cirurgia
M1	< 3 cm (T1) > 3 cm (T2 ou T3)	Mastectomia regional (M1-M2 + linfonodo axilar) Mastectomia unilateral
M2	< 3 cm (T1) > 3 cm (T2 ou T3)	Mastectomia regional (M1, M2, M3 + linfonodo axilar) Mastectomia unilateral
M3	Qualquer tamanho (T1, T2 ou T3)	Mastectomia unilateral
M4	< 3 cm (T1) > 3 cm (T2 ou T3)	Mastectomia regional (M3, M4, M5 + linfonodo inguinal) Mastectomia unilateral
M5	< 3 cm (T1) > 3 cm (T2 ou T3)	Mastectomia regional (M4-M5 + linfonodo inguinal) Mastectomia unilateral
Tumores associados com outros fatores prognósticos negativos devem ser submetidos a mastectomia unilateral		

Fonte: CASSALI *et al.*, (2020).

3.3.1 Avaliação hematológica

Por meio de venopunção com agulha 25 x 0,7 mm acoplada a uma seringa de 10 mL, foram coletadas amostras de 5-8 mL de sangue da veia cefálica ou veia jugular. O sangue foi armazenado em 2 tubos de coleta: 1 tubo com anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) para realização de hemograma, 1 tubo com anticoagulante heparina para análise bioquímica. Para estes exames, a amostra sanguínea foi homogeneizada por um minuto. Em seguida, a amostra foi processada em equipamento pocH-100iV Diff, empresa Sysmex, fornecendo valores de contagem total de hemácias, hematócrito, hemoglobina, volume globular médio, hemoglobina globular média, concentração de hemoglobina globular média, plaquetas e leucócitos totais.

Para análises bioquímicas uma amostra sanguínea foi armazenada e conservada com anticoagulante heparina, sendo analisados o perfil renal (ureia e creatinina) e o hepático (ALT, AST, FA) como de rotina pré cirúrgica. As amostras foram processadas em equipamento Reflotron Plus, da empresa Roche, com kits comerciais. Para obtenção do soro a amostra sem anticoagulante foi colocada em banho-maria a 37 °C por 15 minutos. Após, centrifugada a 3.000 rotações por minuto por 10 minutos. O soro adquirido foi fracionado em quatro alíquotas proporcionais e congeladas a -80 °C até a realização dos ensaios.

3.3.2 Pesquisa de metástases

A avaliação radiográfica para pesquisa de metástase pulmonar foi realizada por meio de 3 radiografias (lâtero-lateral direita, lâtero-lateral esquerda e ventro dorsal). De acordo com Thrall (2019), considera-se positivo para metástase pulmonar os animais que apresentaram padrão pulmonar intersticial estruturado com a existência de nódulos acima de 7 – 9 mm de diâmetro, para evidência radiográfica de metástase pulmonar. A avaliação ecográfica para pesquisa de metástase em órgãos abdominais foi realizada com ênfase em baço, fígado, pâncreas e linfonodos.

3.3.3 Análise Histopatológica

As amostras de tumores mamários e glândulas mamárias sadias foram obtidas de peças cirúrgicas fixadas em formalina a 10% tamponado por 24 a 72 horas. O processamento

histológico de rotina foi realizado junto ao Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). As lesões foram classificadas de acordo com o World Classificação da Organização da Saúde (OMS) (Misdorp *et al.*, 1999), atualizada por Cassali *et al.* (2014, 2017, 2020).

3.3.4 Acompanhamento do estudo

A sobrevida livre de doença (SLD) e a sobrevida global (SG) foram calculadas a partir do dia da cirurgia até o momento da recorrência/metástase ou óbito, respectivamente. A causa da morte foi considerada como morte natural devido à progressão tumoral com ocorrência de metástase à distância, ou eutanásia animal por razões humanitárias em casos de câncer em estágio terminal com presença de metástase à distância juntamente com evidências de sofrimento do animal. Nos casos com mais de um tumor maligno, optou-se pela neoplasia com características histológicas mais agressivas para realizar as associações estatísticas com as variáveis de seguimento e com a sobrevida.

3.4 Avaliação da expressão do gene *ESR1*

3.4.1 Extração de RNA e síntese do cDNA

As amostras de tecidos colhidas na mastectomia foram lavadas com PBS e incubadas em solução de *RNA Later* (Invitrogen, EUA). Os tecidos foram armazenados em geladeira a 4°C por 24 horas e, em seguida, foram congelados a -80°C até a extração do RNA total. O RNA total de 100mg de biópsias de tumores foi extraído utilizando o kit Illustra RNAspin (GE®, EUA) e tratado com DNase I (Invitrogen, Life Technologies) e posteriormente as amostras foram quantificadas em NanoDrop 200TM (Thermo Fisher Scientific, EUA). A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose. Após a extração do RNA total foi realizado o tratamento das amostras com DNase I® (Invitrogen). A síntese da cadeia complementar de DNA (cDNA) foi realizada a partir de 2,0 ug de RNA usando a enzima *transcriptase reversa* (M-MLV Invitrogen).

3.4.2 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (PCR)

Para a padronização da técnica de qPCR foi realizada uma curva de eficiência de cada iniciador, utilizando cDNA de mama normal, na proporção de 1:1, 1:10, 1:20, 1:100 e 1:1000.

Com base nos resultados obtidos para o gene *GAPDH*, a concentração de 1:20 de cDNA foi a escolhida para ser utilizada em todos os experimentos. Os ensaios SYBR Green qPCR foram realizados em um termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems, EUA) para avaliar a expressão do gene *ESR1* e *GAPDH* (gene de referência). Reações de 10 µL foram realizadas em quadruplicatas. Cada reação continha 2 µL de cDNA (diluído 1:20), 2 µL de água, 0,5 µL de cada primer (QUADRO 3) e 5 µL de Master Mix. Os parâmetros da reação qPCR foram os seguintes: uma pré-corrída a 95 °C por 15 min, 45 ciclos com uma etapa de desnaturação de 15 s a 95 °C, seguida por uma etapa de anelamento a 60 °C por 30 s e uma extensão de 72 °C. etapa por 30 s e uma etapa final de extensão a 72 °C por 10 min. Curvas de fusão foram realizadas com aumento de 0,3 °C a cada 30 s. A detecção de fluorescência foi realizada imediatamente ao final de cada etapa de anelamento e a especificidade da amplificação foi confirmada pela análise das curvas de fusão. A eficiência da PCR foi avaliada com o software LinRegPCR (RAMAKERS *et al.*, 2003; RUIJTER *et al.*, 2009). A razão de expressão relativa foi calculada em comparação com a expressão média aritmética do gene de referência *GAPDH* como descrito anteriormente (PFAFFL, 2001).

Quadro 3 - Sequência de primers usados para reação em cadeia da polimerase em tempo real. Fonte: Do autor (2022).

Gene	Sequência do <i>Primer</i> (5' - 3')	Amplicom (pares de bases)	Nº acesso
<i>ESR1</i>	Fw: CACATGCGAGCACATTCCTT Rev: GGTGTGGAGGGTCATGGTCA	189	NM_001286958.2
<i>GAPDH</i> *	Fw: CATTGCCCTCAATGACCACT Rev: TCCTTGGAGGCCATGTGGAC	105	NM_001003142.2

* Gene de referência

3.5 Análise de dados

Os dados da expressão gênica foram analisados pelo teste de Mann-Whitney e teste de Kruskal-Wallis. A análise de correlação entre os dados idade e tamanho dos tumores e expressão gênica foi feita pelo coeficiente de correlação de Spearman. Curvas de sobrevivência foram calculadas usando o método de Kaplan-Meier e o teste de *log rank* foi utilizado para analisar a diferença entre os diferentes grupos definidos para cada variável. Todas as análises estatísticas foram feitas no programa Graphpad Prism 9 (GraphPad Software).

4 RESULTADOS

4.1 Clínico-patológicos

Cento e quatro amostras de tecido mamário de um total de 28 fêmeas caninas foram incluídas neste estudo. Sendo 90 biópsias, colhidas de 21 cadelas com tumores de mama e 14 biópsias de 7 cadelas com mamas saudáveis. Das 21 fêmeas submetidas à ressecção tumoral para tratamento cirúrgico do TMC, a distribuição das raças foi: Shih-tzu (1), Lhasa Apso (1), Pinscher miniatura (2), Poodle (2) e animais sem raça definida (15). A idade das fêmeas acometidas pelo TMCs neste estudo foi entre 6 e 15 anos (média de 11 anos).

Com base na classificação histopatológica do total de 90 lesões identificadas e avaliadas no presente estudo, 21% (19) eram lesões epiteliais não neoplásicas, 2% (2) eram tumores benignos e 77% (69) eram tumores malignos. De todas as 90 lesões analisadas, foram identificados apenas 2 (2,2%) tumores benignos (1 adenoma e 1 tumor misto benigno) em contraste com 19 (21,1%) lesões epiteliais não neoplásicas, compostas de adenose (14), ectasia ductal (2), hiperplasia de células colunares (1), mastite abscedativa (1), papiloma esclerosante (1). Destaca-se a ocorrência de 69 (76,7%) tumores malignos, que em sua maioria foram classificados como carcinoma em um tumor misto (28), carcinoma tubular (15) e carcinossarcoma (10). Outros tipos malignos apresentaram menor ocorrência como carcinoma sólido (6), adenomioepitelioma maligno (5), carcinoma papilar (2), carcinoma micropapilar (2), sarcoma em tumor misto (1).

Dentre os animais com tumores de mama, 19,4 % (4/21) foram diagnosticados com um único tumor e 80,6% (17/21) com múltiplos tumores. Curiosamente, neste estudo verificou-se que os tumores múltiplos foram mais comuns em cadelas com mais idade ($p < 0,017$), com média

de 12,07 anos. A maioria das lesões estava localizada nos dois últimos pares de glândulas mamárias, abdominal caudal (24,0%) e inguinal (29,0%).

Conforme o sistema TMN, 9 cadelas foram classificadas como estágio 3 da doença, significando que os tumores eram grandes, medindo mais de 5 cm, porém não apresentavam nenhuma metástase de acordo com os exames de imagem realizados no dia da cirurgia, 3 pacientes encontravam-se no estágio 4, possuindo metástases em linfonodos e 2 apresentando metástases à distância.

De um total de 21 cadelas com tumores de mama, 15 (71,4%) eram fêmeas intactas e 6 (28,6%) eram fêmeas castradas previamente (pelo menos um ano antes do surgimento do tumor). Animais intactos apresentaram mais lesões do que animais castrados, representando 65,55% (59/90) das lesões. Entre as cadelas intactas, 32,20% (16/59) eram lesões epiteliais não neoplásicas, 3,39% (2/59) eram tumores benignos e os restantes 69,49% (41/59) eram tumores malignos. Entre as cadelas castradas, foram encontradas 9,68% (3/31) lesões epiteliais não neoplásicas e 90,32% (28/31) tumores malignos.

A sobrevida global das cadelas foi avaliada e observou-se uma diferença significativa ($P < 0.05$) conforme o *status* reprodutivo das cadelas. Os animais intactos apresentaram uma sobrevida global de 44,44% aos 720 dias e 88,89% dos animais castrados juntamente com a mastectomia tiveram uma sobrevida de 720 dias após os procedimentos cirúrgicos (Figura 4).

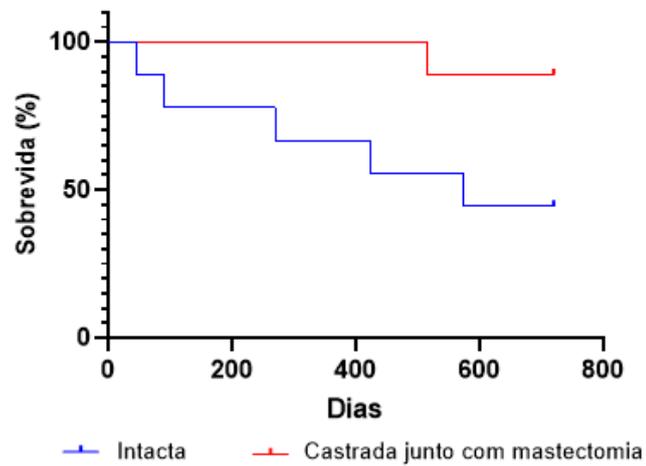


Figura 4 - Curva de Kaplan-Meier mostrando a sobrevida global das cadelas comparado ao *status* reprodutivo. Acompanhamento durante 2 anos (720 dias). Fonte: do autor (2023).

Nestes 2 anos de acompanhamento pós procedimento cirúrgico com exame radiográfico (Figura 5) e ultrassonográfico, 23,8% (5/21) animais apresentaram metástases a distância (4 em pulmão e 1 em fígado).

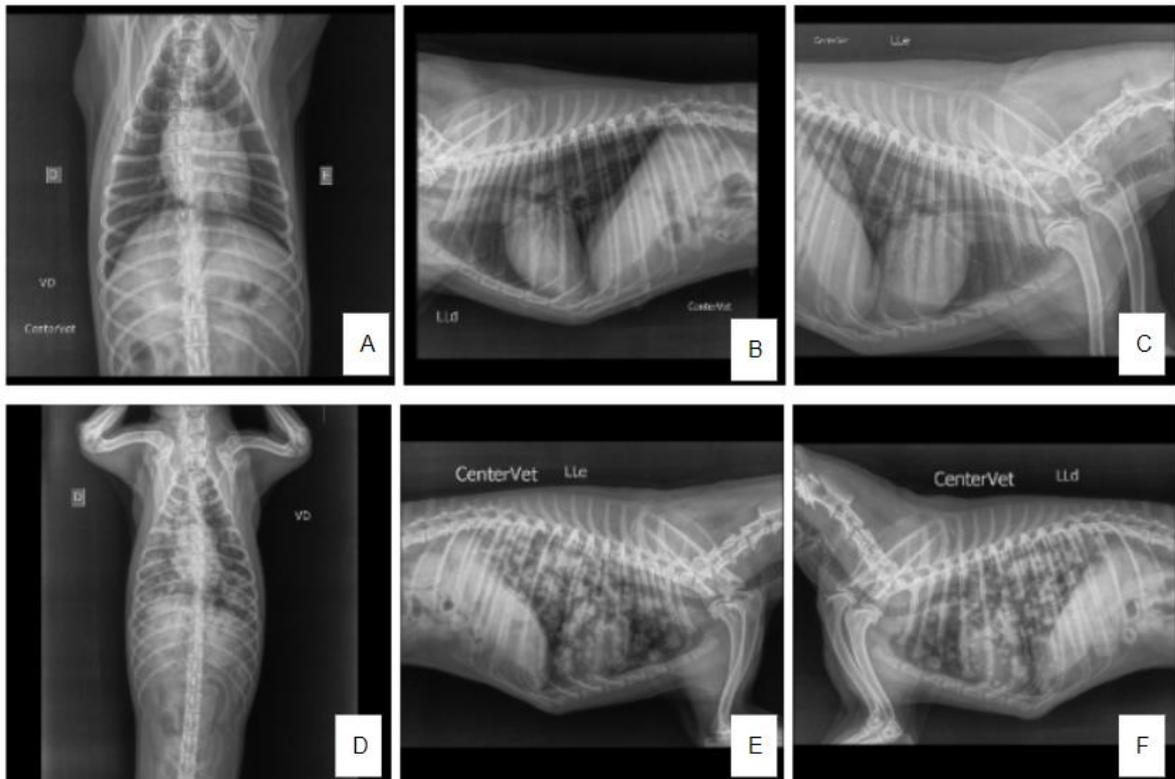


Figura 5 - Exame radiográfico do tórax de fêmea canina evidenciando o surgimento de metástase em parênquima pulmonar. (A-C) Dia 0 (mastectomia). (D-F) Dia 270 (Pós mastectomia). Fonte: do autor (2022).

Não foi observado diferença significativa na correlação entre animais inteiros e castrados no dia da mastectomia e sobrevida livre de doença (SLD) (Figura 6). Um total de 71,43% (15/21) das cadelas ainda estavam vivas ao final do estudo. A sobrevivência média das 21 cadelas foi de 552 dias.

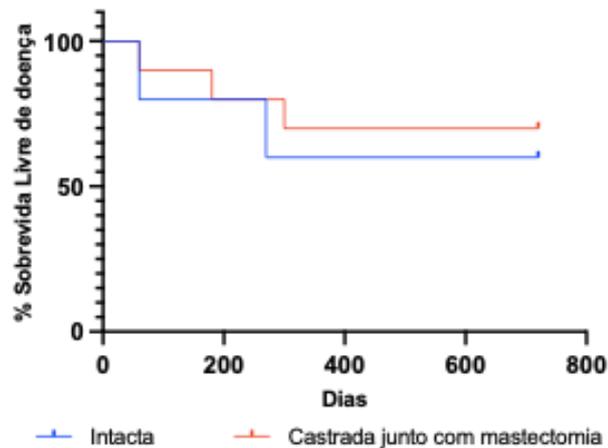


Figura 6 - Curva de Kaplan-Meier mostrando a sobrevida livre de doença comparada ao status reprodutivo. Acompanhamento durante 2 anos (720 dias). Fonte: do autor (2023).

4.2 Níveis de expressão do gene *ESR1*

Para a análise da expressão do gene *ESR1*, as amostras de casos clínicos (90) foram divididas inicialmente em quatro grupos conforme classificação histopatológica: tumores mamários malignos, lesões epiteliais não neoplásicas, tumores benignos e tecido mamário sadio. Foi observado em amostras de tumores malignos uma baixa expressão do gene *ESR1* comparado às amostras de mamas sadias, lesões epiteliais não neoplásicas e tumores benignos (Figura 7). Não foi observado diferença significativa entre tamanho tumoral e expressão do gene *ESR1*.

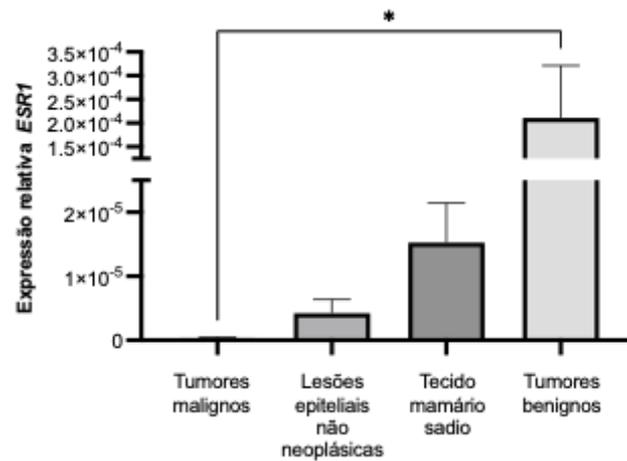


Figura 7 - Quantificação da expressão do gene ESR1 nos diferentes tecidos tumorais. Teste Kruskal Wallis, seguido de teste de Dunn, onde * $P < 0,05$. Fonte: do autor (2023).

Em decorrência da incidência maior de tumores malignos, as amostras de tumores malignos foram agrupadas em carcinomas simples (sólido, papilar e tubular) e carcinomas complexos (Carcinoma em tumor misto e carcinosarcoma). Foi evidenciado que a expressão do gene *ESR1* foi maior em amostras sadias comparado aos carcinomas complexos comparado e carcinomas simples ($P < 0,05$), porém sem diferença significativa entre os grupos tumorais (Figura 8).

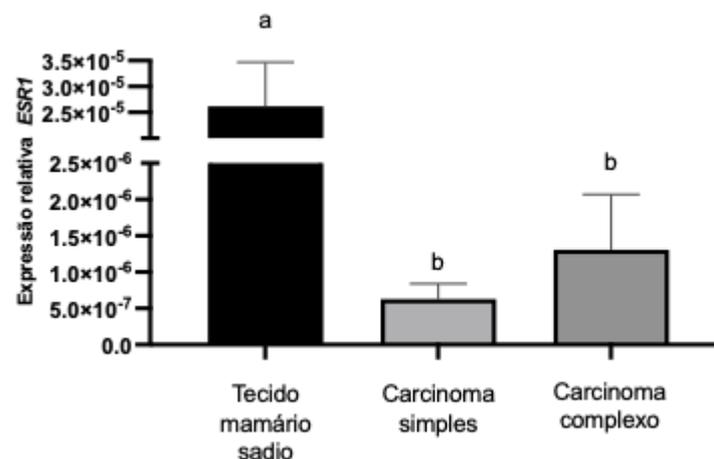


Figura 8 - Quantificação da expressão do gene ESR1 nos diferentes tecidos tumorais correlacionando tecido sadio, carcinomas simples (Carcinoma sólido, papilar e tubular) e carcinomas complexos (Carcinoma em tumor misto e carcinosarcoma). Teste Kruskal Wallis, seguido de teste de Dunn, onde * $P < 0,05$. Fonte: do autor (2023).

Posteriormente as amostras de tumores malignos foram agrupadas de acordo com o prognóstico (GONÇALVES *et al.*, 2021), onde carcinomas do tipo especial representados por carcinoma tubular e sólido apresentam prognóstico ruim/reservado e carcinomas em tumor misto e papilar representam carcinomas de bom prognóstico. Foi verificado que a expressão do gene *ESR1* foi menor em amostras de carcinomas do tipo especial comparado aos do tipo de bom prognóstico (Figura 9).

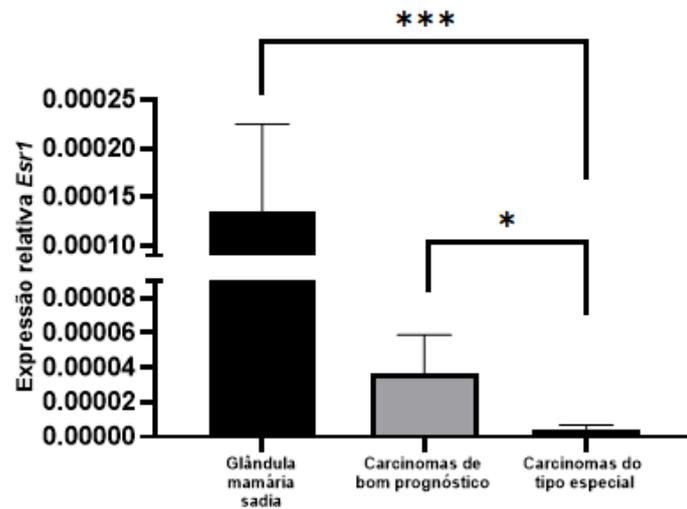


Figura 9 - Quantificação da expressão do gene *ESR1* em carcinomas do tipo especial e carcinomas de bom prognóstico. Teste de Mann Whitney, onde * $P < 0,05$ e *** $< 0,0005$. Fonte: do autor (2023).

5 DISCUSSÃO

Na presente pesquisa foi encontrada uma maior incidência de tumores mamários malignos (76,6%) em cadelas quando comparado a outros estudos, onde foram descritas incidências entre 35% e 85% (MISDORP; HART, 1979; NUNES et al., 2019). No Brasil, estima-se que a incidência de tumores malignos seja superior a 70% (OLIVEIRA-FILHO et al., 2010). Entretanto, dados da literatura americana referem que a incidência de tumores mamários malignos seja em torno de 50% (SORENMO et al., 2013). Já na Europa, a incidência de tumores malignos apresenta variação regional. Na Itália, diferentes levantamentos relataram incidências de 70% (VASCELLARI *et al.*, 2016) e 53,5% (BURRAI *et al.*, 2020). Na Suíça foi descrita uma incidência em torno de 47% (GRÜNTZIG *et al.*, 2015), de tumores malignos. Diferentes fatores podem estar associados às incidências em diferentes regiões, como *status* reprodutivo dos animais acometidos, aplicação de hormônios, fatores ambientais, alimentação, diagnóstico tardio entre outros. No presente levantamento, os carcinomas em tumores mistos foram as neoplasias mais frequentes, o que foi semelhante ao relatado por Souza et al. (2023), seguidos pelo carcinoma tubular e pelos carcinossarcomas.

Não foi possível correlacionar raça ao surgimento de tumores mamários uma vez que a grande maioria das amostras foram obtidas de pacientes sem raça definida. Em outros estudos as raças mais acometidas pelas neoplasias mamárias foram Poodle, Dachshund, Yorkshire Terrier, Maltês, Cocker Spaniel, Pastor Alemão, Boxer, Pointer, Fox Terrier, além dos animais sem raça definida (EGENVALL *et al.*, 2005; OLIVEIRA-FILHO *et al.*, 2010; SORENMO *et al.*, 2013; SALAS *et al.*, 2015; BENAVENTE *et al.*, 2016; BURRAI *et al.*, 2020). Segundo Queiroga e Lopes (2002) não existe predisposição racial evidente, embora as raças de caça sejam apontadas como tendo maior predisposição para esta enfermidade. Mais pesquisadores

referem que a incidência pode variar de acordo com a localização geográfica (EGENVALL *et al.*, 2005) e concordamos sobre esta última citação, visto que existe uma miscelânea de raças de acordo com cada região do país.

A idade de fêmeas com TMC foi entre 6 e 15 anos (média de 11 anos), sendo a idade um fator importante a ser considerado para a ocorrência de TMCs. Nossos resultados vão ao encontro de dados encontrados em outros estudos que observaram o surgimento de lesões em animais com idades entre 9 e 11 anos (CHOI *et al.*, 2016; KIM *et al.*, 2017; BURRAI *et al.*, 2020). Além disso, foram encontrados um maior número de lesões malignas em animais com idades superiores, isso corrobora com o observado por outros autores, onde a maior ocorrência de neoplasias malignas ocorre em animais mais velhos e neoplasias benignas em animais jovens (VASCELLARI *et al.*, 2016; NUNES *et al.*, 2019). Tem sido sugerido que tumores mamários malignos podem se desenvolver dentro de tumores benignos pré-existentes e que cães com lesões pré-malignas, ou com história de tumores mamários benignos prévios, mostram um aumento risco de desenvolver uma nova lesão maligna mamária (SORENMO *et al.*, 2011). A maioria das lesões foram encontradas nas mamas M4 e M5, sendo essas mais abundantes em tecidos mamários. Nota-se esse dado de fundamental importância para o diagnóstico precoce da neoplasia através da palpação das mamas por médicos veterinários e tutores. Conforme o sistema TNM, 9 animais foram classificados como estadiamento 3, com presença de tumores primários maiores que 5 cm. Esse dado corresponde a um diagnóstico possivelmente tardio e com crescimento tumoral prolongado das lesões tumorais.

Dos 21 animais com tumores de mama utilizados no estudo, 15 (71,4%) eram fêmeas intactas e essas apresentaram mais lesões do que animais castrados (59/90). Animais intactos apresentaram 69,49% (41/59) de tumores malignos e animais castrados 90,32% (28/31) de tumores malignos. É importante inferir que a incidência de lesões vem diminuindo em países desenvolvidos, devido principalmente à prática da ovariossalpingohisterectomia (OSH) em animais jovens (SLEECKX *et al.*, 2011). Segundo autores, cadelas castradas antes do primeiro estro têm apenas 0,5% de risco de desenvolver tumores mamários em comparação com cadelas sexualmente intactas. Um risco de 8% e 26% foi relatado para cadelas castradas antes do segundo estro e qualquer estro depois, respectivamente (SCHNEIDER *et al.*, 1969).

As cadelas intactas apresentaram uma sobrevida menor comparadas com os animais castrados no mesmo dia da mastectomia. Enfatizando assim a importância do procedimento da castração quando possível juntamente com a mastectomia. Sorenmo *et al.*, (2000) sugeriram

que a OSH pode ser um complemento eficaz juntamente a remoção do tumor em cães com carcinoma da glândula mamária. Embora todas as cadelas tenham probabilidade de desenvolver neoplasia na glândula mamária à medida que avançam na idade, cadelas intactas apresentam maior incidência de CMT (UÇMAK *et al.*, 2021). Além disso, os hormônios esteroides estão envolvidos na proliferação celular exercendo um efeito antiapoptótico que favorece o desenvolvimento tumoral (CANADAS-SOUSA *et al.*, 2019). Porém o *status* reprodutivo proporciona uma menor exposição aos hormônios ovarianos, os quais possuem importante papel na carcinogênese mamária, beneficiando pacientes que estão predispostos aos tumores benignos.

Durante o período do estudo foi realizado o acompanhamento radiográfico e ultrassonográfico a cada 2 meses nos primeiros 6 meses e a cada 3 meses até os 24 meses de estudo. Foi observado que 23,8% dos animais apresentaram metástase a distância. Esse dado se torna relevante em virtude de conduzir os médicos veterinários a necessidade da requisição de exames de imagem para acompanhamento dos pacientes, uma vez que tiveram pacientes que apresentaram metástase após 250 dias de pós-operatório. Segundo Cassali *et al.* (2020), o estadiamento clínico de fêmeas afetadas por tumores mamários é um passo importante antes do planejamento do tratamento. A metástase distante pode ser detectada no diagnóstico e pode mudar a decisão cirúrgica, por exemplo. A excisão cirúrgica da neoplasia continua sendo o tratamento padrão para a maioria dos cães, exceto em casos de doença altamente metastática inoperável e na maioria das neoplasias inflamatórias (SLEECKX *et al.*, 2011; HORTA *et al.*, 2014).

A castração realizada no momento da remoção do tumor reduz o risco de tumores mamários subsequentes em 47% em cadelas com tumor mamário não benigno e que cães com tumores mamários de grau II, ER-positivos ou níveis séricos de E2 aumentados provavelmente se beneficiarão com o procedimento OSH no momento da remoção dos tumores (KRISTIANSEN *et al.*, 2013). Tal característica reforça as semelhanças entre mulheres e cães em termos do papel da exposição hormonal e do risco de câncer de mama. Em mulheres o risco de câncer de mama está associado com a exposição cumulativa ao longo da vida do tecido mamário a hormônios, sugerindo uma situação semelhante na cadela. Segundo Kristiansen *et al.* (2013), o aumento da exposição hormonal endógena também pode acelerar o desenvolvimento de novos tumores mamários no grupo sem OSH em comparação com o grupo com OSH. Entretanto, em nosso estudo não foi observado diferença estatística entre sobrevivida livre de doença (SLD) em animais intactos ou castrados juntamente a mastectomia. Entende-se

que o benefício da castração se torna aparente, pois tecidos epiteliais mamários normais, lesões epiteliais não neoplásicas e tumores benignos expressam receptores hormonais. Com o tempo, é provável que a exposição contínua a hormônios contribua para os estágios subclínicos iniciais da tumorigênese mamária, resultando em tumores mamários adicionais no grupo de cães que permanecem sexualmente intactos. Sendo assim a OSH adjuvante pode ser considerada no tratamento de cães adultos com tumores mamários.

No presente estudo foram observamos uma maior expressão do gene *ESR1* em tumores benignos, seguido em ordem decrescente de expressão por tecido mamário sadio, lesões epiteliais não neoplásicas e tumores malignos. Segundo YEU *et al* (2013) a importância do receptor de estrógeno é estabelecida no início e progressão do câncer de mama. Muitos trabalhos têm demonstrado uma tendência de perda de expressão do RE α em tumores de mama caninos mais agressivos por imunohistoquímica (PEREZ ALENZA *et al.*, 2000; DE LAS MULAS; MILLÁN; DIOS, 2005; MAINENTI *et al.*, 2014; MILLANTA *et al.*, 2005).

Em decorrência da maior incidência de tumores mamários malignos encontrados no estudo, avaliamos a expressão do gene *ESR1* e foi observado diferença significativa entre tecido mamário sadio e carcinomas simples e complexos. No entanto, a diferença não foi significativa entre os grupos de tumores malignos. Posteriormente, no agrupamento dos tipos histológicos conforme o prognóstico verificou-se que o grupo dos carcinomas do tipo especial apresentaram uma menor expressão do gene *ESR1* comparado ao grupo carcinomas de bom prognóstico e de glândula mamária sadia .

As evidências encontradas nos resultados desta dissertação apontam para uma relação direta entre a malignidade do TMC com a menor expressão de *ESR1* nos tecidos tumorais. Apesar de estudos na espécie canina não serem abundantes, o gene *ESR1* foi caracterizado (WALTER *et al.*, 1985) e vem sendo abundantemente estudado em mulheres com câncer de mama. A complexidade do seu controle de expressão é um dos fatores que dificultam o melhor entendimento no papel da tumorigênese do câncer de mama (LUNG *et al.*, 2020). Na espécie humana, foram identificados múltiplos elementos regulatórios do gene *ESR1*, incluindo a expressão de mRNA a partir de 7 regiões promotoras (CUI *et al.*, 2013). Estudos futuros na espécie canina poderão abordar a homologia estrutural e funcional destas regiões, bem como os fatores de transcrição envolvidos, o que pode contribuir certamente para o melhor entendimento do gene *ESR1* no TMC.

A expressão basal de *ESR1* é fundamental para o desenvolvimento, sobrevivência e proliferação das células mamárias em resposta ao seu ligante fisiológico, o 17 β -estradiol (LUNG *et al.*, 2020). Infelizmente, no presente estudo, não foram feitas dosagens deste hormônio nos pacientes, todavia sabe-se que o desenvolvimento de TMC é estradiol-dependente, e que muitos dos pacientes expressam altos níveis de ER α ou altas concentrações séricas de E2 (>35 pg/mL) (SORENMO *et al.*, 2019). A significativa redução na expressão do gene *ESR1* observada nos tumores com pior prognóstico está de acordo com demais estudos (HARRELL *et al.*, 2007, KHAN *et al.*, 1999), e aponta para a necessidade de mais estudos para entender essa regulação negativa e a patogenicidade do TMC. Uma possível explicação é um efeito de feedback negativo da expressão de *ESR1* pela elevada concentração sérica de estrógenos, como demonstrado previamente. Em linhagens celulares de câncer de mama humano, a supressão da expressão de *ESR1* após estímulo com estradiol envolveu o complexo repressão de expressão SIN3A no promotor proximal (ELLISON-ZELKI *et al.*, 2009), trazendo uma melhor compreensão do sistema de autoregulação da expressão de *ESR1*.

Estudos em humanos também buscaram verificar o controle epigenético da expressão de *ESR1*, onde foi identificado que em tumores ER-negativos, a hipermetilação da ilhas CpG nos promotores A e B do *ESR1* foi diretamente relacionada à baixa resposta a terapias hormonais nas pacientes (IWASE *et al.*, 1999). Ademais, foi descrito que a hipermetilação aumenta com a progressão tumoral (NASS *et al.*, 2000). Porém, destaca-se que a metilação da ilha CpG no gene *ESR1* canino foi estudada, comparando tecido mamário normal e tumores malignos. Entretanto, não foram observadas diferenças na proporção de metilação entre os grupos analisados, portanto, a ausência de expressão de ER α em tumores malignos em cães seria induzida por causas ainda desconhecidas (BRANDÃO *et al.*, 2018).

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, na amostra de pacientes estudada, verificou-se que a expressão do gene *ESR1* foi maior em tumores benignos, seguido por tecido mamário sadio, lesões epiteliais não neoplásicas e tumores malignos. Entre os tumores malignos verificou-se maior expressão em carcinomas de bom prognóstico. Sendo assim, sugere-se a expressão do gene *ESR1* como um biomarcador de bom prognóstico em tumores de mama em cadelas.

REFERÊNCIAS

- ARENDDT, L. M.; KUPERWASSER C. Form and function: how estrogen and progesterone regulate the mammary epithelial hierarchy. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**. 20(1–2):9–25, 2015. Doi: 10.1007/s10911-015-9337-0
- BAYLIN, S. B.; HERMAN, J. G. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. **Trends in Genetics**. 16(4), 168-174, 2000. Doi://doi.org/10.1016/S0168-9525(99)01971-X
- BAILEY, S. T.; WESTERLING, T.; BROWN, M. Loss of estrogen-regulated microRNA expression increases HER2 signaling and is prognostic of poor outcome in luminal breast cancer. **Cancer research**, 75(2), 436-445, 2015. Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1041
- BENAVENTE, M. A; BIANCHI, C. P.; ABA, M. A. Canine mammary tumors: risk factors, prognosis and treatments. **Journal of Veterinary Advances**. 6:1291–300, 2016. Doi:10.5455/jva.20160916045115.
- BRANDÃO Y.O., TOLEDO M.B., CHEQUIN A., CRISTO T.G., SOUSA R.S., RAMOS E.A.S., KLASSEN G. DNA Methylation Status of the Estrogen Receptor α Gene in Canine Mammary Tumors. **Veterinary Pathology**. 55:510–516, 2018. Doi: 10.1177/0300985818763711
- BURRAI, G. P.; GABRIELI, A.; MOCCIA, V.; ZAPPULLI, V.; PORCELLATO, I.; BRACHELENTE, C.; PIRINO, S.; POLINAS, M.; ANTUOFERMO, E. A Statistical Analysis of Risk Factors and Biological Behavior in Canine Mammary Tumors: A Multicenter Study. **Animals**. 10(9), 1687, 2020. Doi:10.3390/ani10091687
- CANADAS-SOUSA, A.; SANTOS, M.; LEAL, B.; MEDEIROS, R.; DIAS-PEREIRA, P. Estrogen receptors genotypes and canine mammary neoplasia. **BMC Veterinary Research**. 15, 325,2019. Doi:10.1186/s12917-019-2062-y
- CASSALI, G. D.; LAVALLE, G. E.; DE NARDI, A. B.; FERREIRA, E.; BERTAGNOLLI, A. C.; ESTRELA-LIMA, A.; ALESSI, A. C.; DALECK, C. R.; SALGADO, B. S.; FERNANDES, C. G.; SOBRAL, R. A.; AMORIM, R. L.; GAMBA, C. O.; DAMASCENO, K. A.; AULER, P. A.; MAGALHÃES, G. M.; SILVA, J. O.; RAPOSO, J. B.; FERREIRA, A. M. R.; OLIVEIRA, L. O.; MALM, C.; ZUCCARI, D. A. P.; TANAKA, N. M.; RIBEIRO, L.

R.; CAMPOS, L. C.; SOUZA, C. M.; LEITE, J. S.; SOARES, J. M. C.; CAVALCANTI, M. F.; FONTENELES, Z. G. C.; SCHUCH, I. D.; PANIAGO, J.; OLIVEIRA, T. S.; TERRA, E. M.; CASTANHEIRA, T. L. L.; FELIX, A. O. C.; CARVALHO, G. D.; GUIM, T. N.; GUIM, T. N.; GARRIDO, E.; FERNANDES, S. C.; MAIA, F. C. L.; DAGLI, M. L. Z.; ROCHA, N. S.; FUKUMASU, H.; GRANDI, F.; MACHADO, J. P.; SILVA, S. M. M. S.; BEZERRIL, J. E.; FREHSE, M. S.; ALMEIDA, E. C. P.; CAMPOS, C. B. Consensus regarding the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**. 4:153-80, 2011. Acesso em <http://www.repositorio.ufba.br/ri/handle/ri/5386>

CASSALI GD., BERTAGNOLLI AC., LAVALLE GE., TAVARES WLF., FERREIRA E., SILVA AE., CAMPOS CB. Perspectives for diagnosis, prognosis and treatment of mammary neoplasms in dogs. 34th World Small Animal Veterinary Congress - WSAVA 2009, 2009, São Paulo. **Proceedings of the 34th World Small Animal Veterinary Congress - WSAVA 2009, 2009**. Acesso em <https://www.vin.com/apputil/content/defaultadv1.aspx?pId=11290&id=4252630>

CASSALI, G. D.; LAVALLE, G. E.; FERREIRA, E.; ESTRELA-LIMA, A.; DE NARDI, A. B.; GHEVER, C.; SOBRAL, R. A.; AMORIM, R. L.; OLIVEIRA, L. O.; SUEIRO, F. A. R.; BESERRA, H. E. O.; BERTAGNOLLI, A. C.; GAMBA, C. O.; DAMASCENO, K. A.; CAMPOS, C. B.; ARAUJO, M. R.; CAMPOS, L. C.; MONTEIRO, L. N.; NUNES, F. C.; HORTA, R. S.; REIS, D. C.; LUVIZOTTO, M. C. R.; MAGALHÃES, G. M.; RAPOSO, J. B.; FERREIRA, A. M. R.; TANAKA, N. M.; GRANDI, F.; UBUKATA, R.; BATSCINSKI, K.; TERRA, E. M.; SALVADOR, R. C. L.; JARK, P. C.; DELECORDI, J. E. R.; NASCIMENTO, N. A.; SILVA, D. N.; SILVA, L. P.; FERREIRA, K. C. R. S.; FREHSE, M. S.; SANTIS, G. W.; SILVA, E. O.; GUIM, T. N.; KERR, B.; CINTRA, P. P.; SILVA, F. B. F.; LEITE, J. S.; MELLO, M. F. V.; FERREIRA, M. L. G.; FUKUMASU, H.; SALGADO, B. S.; TORRES, R. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors - 2013. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**. 7(2):38-69, 2014. Acesso em <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20143275825>

CASSALI, G. D.; DAMASCENO, K. A.; BERTAGNOLLI, A. C.; ESTRELA-LIMA, A.; LAVALLE, G. E.; DI SANTIS, G. W.; DE NARDI, A. B.; FERNANDES, C. G.; COGLIATI, B.; SOBRAL, R.; COSTA, F. V. A.; FERREIRA, E.; SALGADO, B. E.; CAMPOS, C. B.; D'ASSIS, M. J. M. H.; SILVA, L. P.; MACHADO, M. C. A.; FIRMO, B. F.; NUNES, F. C.; NAKAGAKI, K. Y. R. Consensus regarding the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors: benign mixed tumors, carcinomas in mixed tumors and carcinosarcomas. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**. 10(3):87-99, 2017. Doi: 10.24070/bjvp.1983-0246.v10i3p87-99

CASSALI, G. D., JARK, P. C., GAMBA, C., DAMASCENO, K. A., ESTRELA-LIMA, A., DE NARDI, A. B., FERREIRA, E., HORTA, R. S., FIRMO, B. F., SUEIRO, F. A. R., RODRIGUES, L. C. S., NAKAGAKI, K. Y. R. Consensus Regarding the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine and Feline Mammary Tumors-2019. **Brazilian Journal of Pathology**. 13(3), 555-574, 2020. Doi:10.24070/bjvp.1983-0246.v13i3p555-574

CENTER FOR CANCER RESEARCH (Online). Disponível: Center for Cancer Research | National Cancer Institute. Acessado em 4 de Novembro de 2023.

CHEN, F. P.; HEN, F. P.; CHIEN, M. H.; HUANG T. S.; NG, Y. T. Effects of estradiol and progestogens on human breast cells: regulation of sex steroid receptors. **Taiwanese Journal**

of **Obstetrics and Gynecology**. 52(3):365–73, 2013.
Doi:<https://doi.org/10.1016/j.tjog.2012.09.038>

CHOI, J.W.; YOON, H.Y.; JEONG, S.W. Clinical Outcomes of Surgically Managed Spontaneous Tumors in 114 Client-owned Dogs. **Immune Network**. 16 (2):116, 2016.
Doi:10.4110/in.2016.16.2.116.

CUI, J., SHEN, Y., & LI, R. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. **Trends in molecular medicine**, 19(3), 197-209, 2013.
Doi:10.1016/j.molmed.2012.12.007

CROCE, C.M.:Oncogenes and câncer. **The New England Journal of Medicine**, 5: 502-511, 2008. Doi:10.1056/NEJMra072367.

DALECK, C.R.; DE NARDI, A.B.; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**. São Paulo:Roca 1 edição, 2008.

DAVIS, B.W.; OSTRANDER, E.A. Domestic dogs and cancer research: a breed-based genomics approach. **ILAR Journal**. 55: 59-68. 2014. Doi:10.1093/ilar/ilu017

DE CAMPOS, C. B.; LAVALLE, G. E.; FIALHO LIGORIO, S.; CAMARGO NUNES, F.; CARNEIRO, R. A.; AMORIM, R. L. CASSALI G. D. "Absence of significant adverse events following thalidomide administration in bitches diagnosed with mammary gland carcinomas." **Veterinary Record**. 179(20): 514. 2016. Doi: [doi.org/113610./vr.103764](https://doi.org/10.1136/0.vr.103764)

DE LAS MULAS, J. M., MILLÁN, Y., & DIOS, R. A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor α and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. **Veterinary pathology**, 42(2), 200-212, 2005. Doi:10.1354/vp.42-2-200.

DONNAY I, RAUÏS J, DEVLEESCHOUWER N, WOUTERS-BALLMAN P, LECLERCQ G, VERSTEGEN J. Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs. **American Journal of Veterinary Research**. Sep;56(9):1188-94, 1995. PMID: 7486397.

EGENVALL, A.; BONNETT, B. N.; ÖHAGEN, P.; OLSON, P.; HEDHAMMAR, A.; VON EULER, H. 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**, Amsterdam, v. 69, n. 1-2, p. 109–127, 2005. Doi: doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.01.014

ELLISON-ZELSKI, S.J.; SOLODIN, N.M.; ALARID, E.T. Repression of *ESR1* through actions of estrogen receptor alpha and Sin3A at the proximal promoter. **Molecular Cell Biology**. 29:4949–4958, 2009. Doi:10.1128/MCB.00383-09.

FELICIANO, M.A.R.; VICENTE, W.R.R.; LEITE, C.A.L.; SILVEIRA, T. Abordagem ultrassonográfica da neoplasia mamária em cadelas: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.32, n.3, p.197-201, 2008. Disponível em www.cbra.org.br.

FELICIANO, M.A.R.; JOÃO, C. F.; CARDILLI, D. J.; CRIVELARO, R. M.; VICENTE, W. R. R. Neoplasia mamária em cadelas – revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de Medicina Veterinária**, Ano IX , n.1, São Paulo, 2012. Disponível em <http://www.faeef.revista.inf.br>

- FERREIRA E., GOBBI H., SARAIVA BS., CASSALI GD. Histological and immunohistochemical identification of atypical ductal mammary hyperplasia as a preneoplastic marker in dogs. **Veterinary Pathology**. 49, 322-9, 2012. Doi:10.1177/0300985810396105
- FERREIRA E., GOBBI H., SARAIVA B., CASSALI G. Columnar cell lesions of the canine mammary gland: pathological features and immunophenotypic analysis. **BMC Cancer**. 10, 1-7, 2010. Doi:10.1186/1471-2407-10-61
- FERREIRA, E.; BERTAGNOLLI, A. C.; CAVALCANTI, M. F.; SCHMITT, F. C.; CASSALI, G. D. The relationship between tumor size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumors. **Veterinary Comparative Oncology**. 193:1-6, 2009. Doi:10.1111/j.1476-5829.2009.00193.x.
- FRANDSON, R. D. Anatomia das glândulas mamárias. In: FRANDSON, R. D. **Anatomia e Fisiologia dos Animais Domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.366-73, 1979.
- GARDNER, H. L.; FENGER, J. M.; LONDON, C. A. Dogs as a model for Cancer. **Annual Review Animal Bioscience**. 4:199–222, 2016. Doi:10.1146/annurev-animal-022114-110911
- GILBERTSON, S.R.; KURZMAN, I.D.; ZACHRAU, R.E.; HURVITZ, A.I.; BLACK, M.M. Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. **Veterinary Pathology**. 20(2):127–42, 1983. Doi:10.1177/030098588302000201
- GOLDSCHMIDT, M.; PEÑA, L.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V. Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**. 88(1):117-31, 2011. Doi:10.1177/0300985810393258
- GONÇALVES, A. D. B. B., DE PINHO, T. R., TOLEDO, F. A. O., BALABRAM, D., FERREIRA, E., CAMPOS, M. R. A., & CASSALI, G. D. Extracapsular extension and tumor implants in lymph nodes with canine mammary carcinoma metastasis: Study of the impact on survival. **Research in Veterinary Science**, 139, 87-93, 2021. Doi:10.1016/j.rvsc.2021.07.010
- GRÜNTZIG, K.; GRAF, R.; HÄSSIG, M.; WELLE, M.; MEIER, D.; LOTT, G.; ERNI, D.; SCHENKER, N. S.; GUSCETTI, F.; BOO, G.; AXHAUSEN, K.; FABRIKANT, S.; FOLKERS, G.; POSPISCHIL, A. The Swiss canine cancer registry: a retrospective study on the occurrence of tumours in dogs in Switzerland from 1955 to 2008. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 152, n. 2-3, p. 161–171, 2015. Doi:10.1016/j.jcpa.2015.02.005
- HANAHAN, D. WEINBERG, R.A.: Hallmarks of câncer: the next generation. **Cell**, 144: 646-674, 2011. Doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- HARRELL, J.C; DYE, W.W.; HARVELL, D.M.; PINTO, M.; JEDLICKA, P.; SARTORIUS, C.A.; HORWITZ, K.B. Estrogen insensitivity in a model of estrogen receptor positive breast cancer lymph node metastasis. **Cancer Research**. 67:10582–10591, 2007. Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1655.
- HILTON, N.; CLARKE, L.; GRAHAM, D. Estrogen and progesterone signalling in the normal breast and its implications for cancer development. **Molecular and Cellular Endocrinology**. 466:2–14, 2018. Doi:10.1016/j.mce.2017.08.011

HORTA, R. S.; LAVALLE, G. E.; DE CASTRO CUNHA, R. M.; DE MOURA, L. L.; DE ARAÚJO, R. B.; CASSALI, G. D. Influence of surgical technique on overall survival, disease free interval and new lesion development interval in dogs with mammary tumors. **Advances in Breast Cancer Research**. 3:38-46, 2014. Doi:10.4236/abcr.2014.32006

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/>

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. 2011.

INSTITUTO PETBRASIL. **Anuário PetBrasil 2020**. Disponível em: [https://www.instituto Pet Brasil](https://www.instituto-pet-brasil.com.br/). Acesso em 9 de Novembro de 2023.

IWASE, H.; OMOTO, Y.; IWATA, H.; TOYAMA, T.; HARA, Y.; ANDO, Y.; ITO, Y. FUJII, Y.; KOBAYASHI, S. DNA methylation analysis at distal and proximal promoter regions of the oestrogen receptor gene in breast cancers. **British Journal of Cancer**. 80:1982–1986, 1999. Doi:10.1038/sj.bjc.6690631

JEMAL, A. BRAY F, CENTER MM, FERLAY J, WARD E, FORMAN D. Global cancer statistics. **Cancer journal for clinicians**, v. 61, n. 2, p. 69-90, 2011. doi.org/10.3322/caac.20107

KENT, M. S.; BURTON, J. H.; DANK, G.; BANNASCH, D. L.; REBHUN, R. B. Association of cancer-related mortality, age and gonadectomy in golden retriever dogs at a veterinary academic center (1989-2016). **PLOS ONE**. 13, e0192578, 2018. Doi: doi.org/10.1371/journal.pone.0192578

KHAN, S.A.; SACHDEVA, A.; NAIM, S.; MEGUID, M.M.; MARX, W.; SIMON, H.; HALVERSON, J.D.; NUMANN, P.J. The normal breast epithelium of women with breast cancer displays an aberrant response to estradiol. **Cancer epidemiology, Biomarkers & Prevention** : a publica- tion of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology 8: 867–872, 1999. Acesso em <https://www.scholars.northwestern.edu>

KIM, H. W.; JU, J. H.; SHIN, J. I.; SEUNG, B. J.; SUR, J. H. Differential and correlated expressions of p16/p21/p27/p38 in mammary gland tumors of aged dogs. **Journal of Veterinary Science**. 18 (4), 479-485, 2017. Doi: doi:10.4142/jvs.2017.18.4.479

KOLB, E. **Fisiologia veterinária**. Fisiologia da glândula mamária. 4.ed. Rio de Janeiro. Guanabara-Koogan, p.413-4, 1987.

KRISTIANSEN, V. M.; NØDTVEDT, A.; BREEN, A. M.; LANGELAND, M.; TEIGE, J.; GOLDSCHMIDT, M.; SØRENMO, K. Effect of ovariohysterectomy at the time of tumor removal in dogs with benign mammary tumors and hyperplastic lesions: a randomized controlled clinical trial. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 27(4), 935-942, 2013. Doi:10.1111/jvim.12110

KRÓLIK, M, MILNEROWICZ, H. The effect of using estrogens in the light of scientific research. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**. 2012 Jul-Aug;21(4):535-43. PMID: 23240460.

KUMAR, A.; SINGH, S. K.; SAXENA, S.; LAKSHMANAN, K.; SANGAIAH, A. K.; CHAUHAN, H.; SINGH, R. K. Deep feature learning for histopathological image

classification of canine mammary tumors and human breast cancer. **Information Sciences**, 508, 405-421, 2020. Doi:10.1016/j.ins.2019.08.072

KUSEWITT, D. F.; RUSH, L. J. Neoplasia and Tumor Biology. **Pathologic Basis of Veterinary Disease** J. F. Zachary and M. D. McGavin, Elsevier Health Sciences, 2016.

LANA, S. E.; RUTTEMAN, G. R.; WITHROW, S. J. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M.; WITHROW, S. J., MacEWEN, E.G. **Small Animal Clinical Oncology**. 4.ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007. p.619-636.

LAVALLE, G. E.; DE CAMPOS, C. B.; BERTAGNOLLI, A. C.; CASSALI, G. D. Canine malignant mammary gland neoplasms with advanced clinical staging treated with carboplatin and cyclooxygenase inhibitors." **In Vivo**. 26(3): 375-379, 2012. PMID: 25189900

LEVITT, N.C.; HICKSON, I.D.: Caretaker tumour suppressor genes that defend genome integrity. **Trends in Molecular Medicine**. 8: 179-186, 2002. Doi:10.1016/s1471-4914(02)02298-0

LIM, W.; MAYER, B.; T PAWSON. **Cell signaling: principles and mechanisms**. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, 2015.

LUBAHN, D. B.; MOYER, J. S.; GOLDING, T. S.; COUSE, J. F.; KORACH, K. S.; SMITHIES, O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 90(23), 11162-11166, 1993. Doi:10.1073/pnas.90.23.11162.

LUNG, D.K.; REESE, R.M.; ALARID, E.T. Intrinsic and Extrinsic Factors Governing the Transcriptional Regulation of *ESR1*. **Hormones and Cancer**. 11, 129–147, 2020. Doi:10.1007/s12672-020-00388-0

MACIAS, H.; HINCK, L. Mammary gland development. **Wiley Interdisciplinary Review Developmental Biology**. 1(4):533–57. 2012. Doi:10.1002/wdev.35

MAINENTI, M.; RASOTTO, R.; CARNIER, P. Oestrogen and progesterone receptor expression in subtypes of canine mammary tumours in intact and ovariectomised dogs. **The Veterinary Journal**. 202:62–8, 2014. Doi:10.1016/j.tvjl.2014.06.003

MARCONATO, L.; ROMANELLI, G.; STEFANELLO, D.; GIACOBONI, C.; BONFANTI, U.; BETTINI, G.; FINOTELLO, R.; VERGANTI, S.; VALENTI, P; CIARAMELLA, L.; ZINI, E. Prognostic factors for dogs with mammary inflammatory carcinoma: 43 cases (2003–2008). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 235(8), 967-972, 2009. Doi:10.2460/javma.235.8.967.

McPHERSON, K.; STEEL, C.M.; DIXON, J.M.: ABC of Breast Diseases Breast cancer—epidemiology, risk factors, and genetics. **BMJ** V. 321 (9), 2000. Doi:10.1136/bmj.321.7261.624

MERLO, D.F.; ROSSI, L.; PELLEGRINO, C.; CEPPI, M.; CARDELLINO, U.; CAPURRO, C.; RATTO, A.; SAMBUCCO, P. L.; SESTITO, V.; TANARA, G.; BOCCHINI, V. Cancer incidence in pet dogs: findings of the animal tumor registry of Genoa, Italy. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. 22, 976–984, 2008. doi.org/10.1111/j.1939-1676.2008.0133.x.

MILLANTA, F.; CALANDRELLA, M.; BARI, G. Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. **Research in Veterinary Science**. 79:225–32, 2005. Doi: doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.02.002

Misdorp, W., & Hart, A. A. M. (1979). Canine mammary cancer: I. Prognosis. **Journal of Small Animal Practice**, 20 (7), 385-394, 1979. Doi:10.1111/j.1748-5827.1979.tb06743.x

MISDORP, W.; ELSE, R. W.; HELLMÉN, E. **Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat**. 2nd Series. Vol VII. Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology and the World Health Organization Collaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology. p.1-59, 1999. Doi:10.1354/vp.38-6-733

MOE, L. Population-based incidence of mammary tumours in some dog breeds. **Journal of Reproduction and Fertility Suppl**. 2001;57:439–43. PMID: 11787188

MORRIS, J. S.; DOBSON, J. M.; BOSTOCK, D. E.; O'FARRELL, E. "Effect of ovariectomy in bitches with mammary neoplasms." **Veterinary Record**. 142 (24): 656-658, 1998. Doi:10.1136/vr.142.24.656.

NASS, S.J.; HERMAN, J. G.; GABRIELSON, E.; IVERSEN, P. W.; PARL, F.F.; DAVIDSON, N.E.; GRAFF, J.R. Aberrant methylation of the estrogen receptor and E-cadherin 5' CpG islands increases with malignant progression in human breast cancer. **Cancer Research**. 60:4346– 4348, 2000.

NOVOSAD, C. A. Principles of treatment for mammary gland tumors. **Clinical techniques in small animal practice**, 18(2),107-109, 2003. Doi:10.1053/svms.2003.36625

NUNES, F. C.; DAMASCENO, K. A.; DE CAMPOS, C. B.; BERTAGNOLLI, A. C.; LAVALLE, G. E.; CASSALI, G. D. Tumores mistos das glândulas mamárias caninas: avaliação de fatores prognósticos, tratamento e sobrevida global. **Veterinária e Zootecnia**, 7 2019. Doi:10.1016/j.vas.2018.09.003.100039.

OLIVEIRA-FILHO, J. C.; KOMMERS, G. D.; MASUDA, E. K.; MARQUES, M. F. P. P.; FIGHERA, R. A.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C. S. L. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 30, n. 2, p. 177–185, 2010. Doi.org/10.1590/S0100-736X2010000200014

OWEN, L. N. **TNM Classification of tumors in domestic animals**. Geneva: World Health Organization. 1980.

PARL, F.F.; DAWLING, S.; ROODI, N.; CROOKE, P. S. Estrogen metabolism and breast cancer: a risk model. **Annals of New York Academy Science**. 1155:68–75, 2009. Doi:10.1111/j.1749-6632.2008.03676.x

PENA, L.; GAMA, A.; GOLDSCHMIDT, M. H.; ABADIE, J.; BENAZZI, C.; CASTAGNARO, M.; DÍEZ, L.; GÄRTNER, F.; HELLMÉN, E.; KIUPEL, M.; MILLÁN, Y.; MILLER, M. A.; NGUYEN, F.; POLI, A.; SARLI, G.; ZAPPULLI, V.; MARTÍN DE LAS MULAS, J. Canine mammary tumors: a review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**. 51:127–45, 2014. Doi:10.1177/0300985813509388

- PEREZ ALENZA, M.D.; PEÑA, L.; DEL CASTILLO, N. NIETO, A.I. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. **Journal of Small Animals Practice**. 41(7):287-91, 2000 Doi:10.1111/j.1748-5827.2000.tb03203.x.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, 29(9), 2001. Doi:10.1093/nar/29.9.e45.
- PRESS, M. F.; NOUSEK-GOEBL, N. A.; BUR, M.; GREENE, G. L. Estrogen receptor localization in the female genital tract. **The American journal of pathology**, 123(2), 280, 1986. PMID: 2939725
- QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos fatores de prognóstico. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v. 97, p.119 – 27, 2002. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-6360>.
- RAMAKERS, C.; RUIJTER, J.M.; DEPREEZ, R.H.; MOORMAN, A.F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letter**. 339, 62– 66, 2003. Doi:10.1016/s0304-3940(02)01423-4.
- RAZANDI, M.; PEDRAM, A.; GREENE, G. L.; LEVIN, E. R. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ER α and ER β expressed in Chinese hamster ovary cells. **Molecular endocrinology**, 13 (2), 307-319, 1999. <https://doi.org/10.1210/mend.13.2.0239>.
- RUIJTER, J. M.; RAMAKERS, C.; HOOGAARS, W. M. H.; KARLEN, Y.; BAKKER, O.; VAN DEN HOFF, M. J. B.; MOORMAN, A. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. **Nucleic acids research**, 37(6), e45-e45, 2009. Doi:10.1093/nar/gkp045.
- SOUZA, M. C. C. D.; FLECHER, M. C.; ARRAIS, F. M.; SENA, B. V. D.; GIULIANO, A.; HORTA, R. D. S. Comparison of surgical resection of Axillary Lymph Nodes in Dogs with Mammary Gland Tumors with or without sentinel lymph node visualization with patent blue dye. **Frontiers in Veterinary Science**, 10, 1149315, 2023.
- VARALLO, R. G.; GELALETI, G.B.; MASCHIO-SIGNORINI, L.B.; MOSCHETTA, M.G.; LOPES, J.R.; DE NARDI, A.B.; TINUCCI-COSTA, M.; ROCHA, R.M.; DE CAMPOS ZUCCARI, D.A.P. Prognostic phenotypic classification for canine mammary tumors. **Oncology Letters**. 18, 6545–655, 2019. Doi:10.3892/ol.2019.11052
- SADIKOVIC, B.; AL-ROMAIIH, K.; SQUIRE, J.A.; ZIELENSKA, M.: Cause and consequences of genetic and epigenetic alterations in human câncer. **Current Genomics**. 6: 394-408, 2008. Doi:10.2174/138920208785699580
- SALAS, Y.; MARQUEZ, A.; DIAZ, D.; ROMERO, L. Epidemiological study of mammary tumors in female dogs diagnosed during the period 2002–2012. A growing animal health problem. **PLoS ONE**, 2015. Doi:10.1371/journal.pone.0127381
- SANTEN, R.; CAVALIERI, E.; ROGAN, E.; RUSSO, J.; GUTTENPLAN, J.; INGLE, J.; YUE, W. Estrogen mediation of breast tumor formation involves estrogen receptor-dependent, as well as independent, genotoxic effects. **Annals of New York Academy Science**. 1155:132–40, 2009. Doi: 10.1111/j.1749-6632.2008.03685.x.

SCHNEIDER, R.; DORN, C. R.; TAYLOR, D.O. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. **Journal of National Cancer Institute**. 43(6):1249–61, 1969. Doi:doi.org/10.1093/jnci/43.6.1249

SCHIFFMAN, J. D.; BREEN, M. Comparative oncology: what dogs and other species can teach us about humans with cancer. **Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Science**. 370:20140231, 2015. Doi:<https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0231>

SIEGEL, R.L.; MILLER, K.D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2019. **CA A Cancer Journal for Clinicians**. 69(1):7–34, 2019. Doi: 10.3322/caac.21551

SLEECKX, N.; DE ROOSTER, H.; VELDHUIS KROEZE, E. J.; VAN GINNEKEN, C.; VAN BRANTEGEM, L. Canine mammary tumours, an overview. **Reproduction in Domestic Animals**. Dec;46(6):1112–31, 2011. Doi: 10.1111/j.1439-0531.2011.01816.x.

SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. **The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**. 33:573-96, 2003. Doi:10.1016/s0195-5616(03)00020-2

SORENMO, K. U.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V.; GOLDSCHMIDT, M. H. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. **Veterinary Pathology**, New York, v. 48, n. 1, p. 85–97, 2011. Doi:10.1177/0300985810389480

SORENMO, K. U.; WORLEY, D. R.; GOLDSCHMIDT, M. H. Tumors of the mammary gland. In: **Small Animal Clinical Oncology**. 5th. ed. Saint Louis: Elsevier Saunders, 2013. p. 538–547.

SORENMO, K. U.; SHOFER, F. S.; GOLDSCHMIDT, M. H. Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. 14(3):266–70, 2000. Doi:10.1892/0891-6640(2000)014<0266:eosato>2.3.co;2

SORENMO, K.U.; DURHAM, A.C.; RADAELLI, E.; KRISTIANSEN, V.; PEÑA, L.; GOLDSCHMIDT, M.H.; STEFANOVSKI, D. The estrogen effect; clinical and histopathological evidence of dichotomous influences in dogs with spontaneous mammary carcinomas. **PLoS ONE**. 14, e0224504, 2019. Doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224504>

STERNLICHT, M. D.; KOUROS-MEHR, H.; LU, P.; WERB, Z. Hormonal and local control of mammary branching morphogenesis. **Differentiation**. 74(7):365–81, 2006. Doi: 10.1111/j.1432-0436.2006.00105.x

STINGL, J. Estrogen and progesterone in normal mammary gland development and in cancer. **Hormones and Cancer**. 2(2):85–90, 2011. Doi: 10.1007/s12672-010-0055-1

TAVARES, W. L.; LAVALLE, G. E.; FIGUEIREDO, M. S.; SOUZA, A. G.; BERTAGNOLLI, A. C.; VIANA, F. A.; CASSALI, G. D. Evaluation of adverse effects in tamoxifen exposed healthy female dogs. **Acta Veterinaria Scandinavica**, 52, 1–6, 2010. Acesso em <https://link.springer.com/article/10.1186/1751-0147-52-67>

THRALL, D. E. **Diagnóstico de radiologia veterinária**. Elsevier Editora Ltda., 2019.

TIMMERMANS-SPRANG, E. P.; GRACANIN, A.; MOL, J. A. Molecular signaling of progesterone, growth hormone, Wnt, and HER in mammary glands of dogs, rodents, and

humans: new treatment target identification. **Frontiers in Veterinary Science**. 4, 53, 2017. Doi:10.3389/fvets.2017.00053

UÇMAK, Z. G.; KOENHEMSI, L.; UÇMAK, M. O. R.; BAMAÇ, Ö. E., GÜRGEN, H. Ö., & YARAMIŞ, Ç. P. Evaluation of platelet indices and complete blood count in canine mammary tumors. **Acta Scientiae Veterinariae**, 49, 2021.

UÇMAK, Z. G.; KOENHEMSI, L.; UÇMAK, M.; OR, M. E.; BAMAÇ, Ö. E.; GÜRGEN, H. Ö.; YARAMIŞ, Ç. P. Evaluation of platelet indices and complete blood count in canine mammary tumors. **Acta Scientiae Veterinariae**, 49, 2021. Doi:10.1016/j.anicom.2020.07.002

VASCELLARI, M.; CAPELLO, K.; CARMINATO, A.; ZANARDELLO, C.; BAIONI, E.; MUTINELLI, F. Incidence of Mammary Tumors in the canine population living in the veneto region (Northeastern Italy): risk factors and similarities to human breast cancer. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 126, p. 183–189, 2016. Doi:10.1016/j.prevetmed.2016.02.008. doi:10.1016/j.prevetmed.2016.02.008

VINOGRADOVA, Y.; COUPLAND, C.; HIPPISEY-COX, J. Use of hormone replacement therapy and risk of breast cancer: nested case-control studies using the QResearch and CPRD databases. **BMJ**. Oct 28;371:m3873. 2020. Doi: 10.1136/bmj.m3873.

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Câncer genes and the pathways they control. **Nature Medicine**. 10: 789-799, 2004. Doi:10.1038/nm1087.

WALTER, P.; GREEN, S.; GREENE, G.; KRUST, A.; BORNERT, J.M.; JELTSCH, J. M.; STAUB, A.; JENSEN, E.; SCRACE, G.; WATERFIELD, M. Cloning of the human estrogen receptor cDNA. **Proceedings of National Academy Science U S A** 82: 7889–7893, 1985. Doi.org/10.1073/pnas.82.23.7889.

WEIGELT B, REIS-FILHO JS. Back to the basis: breast cancer heterogeneity from an etiological perspective. **Journal of National Cancer Institute**. Aug 12;106(8):dju211, 2014. doi: 10.1093/jnci/dju211.

YUE W, YAGER JD, WANG JP, JUPE ER, SANTEN RJ. Estrogen receptor-dependent and independent mechanisms of breast cancer carcinogenesis. **Steroids**. Feb;78(2):161-70, 2013 doi: 10.1016/j.steroids.2012.11.001.

ZAHA, DANA CARMEN. Significance of immunohistochemistry in breast cancer. **World journal of clinical oncology**, v. 5, n. 3, p. 382, 2014. Doi:10.5306/wjco.v5.i3.382

ZUCCARI, D. A. P. C.; SANTANA, A. E.; ROCHA, N. S. Correlação entre biópsia aspirativa por agulha fina e a histologia no diagnóstico de tumores mamários de cadelas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.38, n.1, p.1-8, 2001. Doi: doi.org/10.1590/S1413-95962001000100007

ZUCCARI, D. A.; PAVAM, M. V.; TERZIAN, C. B.; PEREIRA, R. S.; RUIZ, C. M.; ANDRADE, J. C. Immunohistochemical evaluation of e-cadherin, Ki-67 and PCNA in canine mammary neoplasias: correlation of prognostic factors and clinical outcome. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 28, 207-215, 2008. Doi: 10.1590/S0100-736X2008000400003

ANEXOS

ANEXO 1 - Certificado de aprovação do CEUA

Certificado nº 045/CEUA/UNIVATES

Lajeado, 07 de maio de 2021

De: Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Univates

Para (pesquisador responsável): Ivan Cunha Bustamante Filho

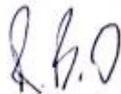
Número protocolo Ceua/Univates: 23

Prezado pesquisador

Certificamos que o protocolo intitulado *“Avaliação de biomarcadores para diagnóstico precoce de tumor de mama canino”* registrado com o número de protocolo Ceua/Univates nº 23, sob responsabilidade de Ivan Cunha Bustamante Filho - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foram avaliadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Univates (Ceua/Univates).

A Ceua/Univates está vinculada à Fundação Vale do Taquari de Educação e Desenvolvimento Social (FUVATES) que é credenciada no Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) sob nº 01.0329.2014.

Considerando que o artigo 6º da Resolução Normativa CONCEA nº 01/2010, diz que *“compete aos CEUAs examinar previamente os protocolos experimentais ou pedagógicos aplicáveis aos procedimentos de ensino e de projetos de pesquisa científica a serem realizados na instituição à qual esteja vinculada, para determinar sua compatibilidade com a legislação aplicável”*, o seu projeto foi enquadrado na categoria **EM PENDÊNCIAS**.



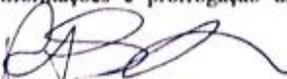
Abaixo detalhes do parecer:

Finalidade do Projeto:	<input type="checkbox"/> Ensino	<input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa científica
Duração do experimento:	01 ano podendo ser prorrogada	Início previsto: 01/06/21
		Término previsto: 01/06/22
Vigência da autorização:	12 meses	
Local de execução do projeto:	As cirurgias ocorrerão em clínicas particulares, onde os tecidos serão coletados.	
Procedência dos animais:	Cães com tumor de mama atendidos no Centro Clínico Veterinário de Teutônia (Centervet)	
Espécie/linhagem/raça (modelo animal utilizado):	Canina	
Número de animais, peso/idade, sexo (características do modelo):	25 animais - 3 – 30 kg - F	
Grau de Invasividade:	<input checked="" type="checkbox"/> GI1	<input type="checkbox"/> GI2 <input type="checkbox"/> GI3 <input type="checkbox"/> GI4

Considerações do Ceua/Univates:

A Ceua recomenda a aprovação da proposta de pesquisa.

De acordo legislação, cabe aos membros do Ceua/Univates, determinar a validade dos certificados por eles emitidos e portanto, já adiantamos que, o novo certificado a ser emitido após regularização da pendência acima descrita, terá validade máxima de 1 ano. Esclarecemos que é possível atualização de informações e prorrogação da validade do Certificado a qualquer tempo.


Ramatis Birnfeld de Oliveira
 Coordenador Adjunto da Ceua/Univates
 Portaria nº 129/Reitoria/Univates de 04/jan/21

Recebido por: Data:

ANEXO 1 - Termo de Consentimento livre e esclarecido - TCLE.

Termo de Consentimento livre e esclarecido - TCLE

Termo de autorização para uso de animais em estudo

Eu, _____, portador do documento de identidade _____, autorizo a participação do animal de minha propriedade _____, canino, em mastectomia regional a ser realizado no Centro Clínico Veterinário de Teutônia. Estou ciente de que: Será utilizado o protocolo anestésico pré-estabelecido no estudo; O meu animal não sofrerá, em hipótese alguma, maus tratos. Todas as minhas dúvidas a respeito da participação do meu animal no referido estudo foram esclarecidas e concordo com os termos acima.

Proprietário _____

Médico Veterinário _____

Teutônia, ____ de _____ de _____.

ANEXO 3 - Ficha de avaliação oncológica.

Ficha de avaliação oncológica

Data: ___/___/___ Ficha n.º: _____

Nome do animal: _____

Escore corporal: _____ Alimentação: () Ração () Caseira

Ambiente: _____

Antecedentes genéticos: _____

Doenças anteriores e atuais: _____

Medicamentos: (N) (S)

Qual/Tempo: _____

Anticoncepcional: (N) (S) Quanto/Qual: _____ Última data: _____

Cio Regular (N) (S) Último: _____ Castração: (N) (S) Quando: _____

Pseudogestações: () Regulares () Intermitentes () Nunca Obs.: _____

Partos: (N) (S) Quantos: _____ Último: _____ Obs.: _____

Abortamentos: (N) (S) Quantos: _____ Último: _____ Obs.: _____

Já cruzou e não emprenhou: (N) (S) Secreção vaginal: (N) (S)

Quando/Intensidade: _____

Linfonodos (Tamanho, forma e consistência)

Axilar direito: _____

Axilar esquerdo: _____

Inguinal superficial direito: _____

Inguinal superficial esquerdo: _____

Exame complementar: _____

Outros linfonodos: _____

Edema de membros (N) (S) _____

Caracterização dos nódulos

Localização; único ou múltiplos; quantidade; tamanho; íntegro, ulcerado ou cístico; consistência; forma regular ou irregular; secreção etc.

Exames complementares:

_____ Pesquisa por metástases:

_____ Classificação TNM para

a massa principal: _____ **Tamanho do tumor**

primário: () T0: Ausente; () T1: < 3cm; () T2: 3-5cm; () T3: > 5cm; () T4:

Inflamatório

Aderência do tumor primário: () a: Não aderido; () b: Aderido à pele;

() c: Aderido ao músculo

Linfonodos regionais: () N0: Sem evidência de metástase;



UNIVATES

R. Avelino Talini, 171 | Bairro Universitário | Lajeado | RS | Brasil
CEP 95914.014 | Cx. Postal 155 | Fone: (51) 3714.7000
www.univates.br | 0800 7 07 08 09