

Fatores de prognóstico em carcinomas mamários caninos e sua relação com expressão de HER2

Prognostic Factors in Canine Mammary Carcinomas and HER2 Expression Relationship

Nicolle Pereira Soares, Alessandra Aparecida Medeiros, Igor de Paula Castro, Taís Meziara Wilson, Thaís de Almeida Moreira & Mariana Batista Andrade

ABSTRACT

Background: The human epidermal growth factor type 2 (HER2) receptor is a membrane glycoprotein tyrosine kinase. In woman, HER2 expression is diagnosed in 30% of breast carcinomas and it is associated with a worse prognosis, higher rate of recurrence and mortality. In the bitch, the HER2 overexpression in canine mammary tumors is still controversial and the prognostic value remains uncertain. Thus, we aimed to verify the HER2 expression in canine mammary carcinomas and relate it to the type and histological grade, lymph node metastasis and clinical staging.

Materials, Methods & Results: Ninety bitches diagnosed with mammary carcinoma were included in this study. The inclusion criteria were bitches with complete clinical examination, thoracic radiographic examination and submitted unilateral or bilateral mastectomy. Ninety-nine samples of mammary carcinoma were used and the fragments of tumor and regional lymph nodes were fixed in 10% neutral formalin for histopathological and immunohistochemistry analysis. The lesions were evaluated by two pathologists and classified according to the type and histological grade. HER2 expression was performed by semi-quantitative analysis of the slides according to the HerceptTest™ (Dako) recommended score. Simple carcinomas were the most frequent (51.51%) followed by complex carcinomas (46.47%) and *in situ* carcinoma (2.02%). The histological grade of 97 carcinoma samples was attributed, except *in situ* carcinoma, 37 (38.14%) of the neoplasms were grade I, 50 (51.55%) grade II and only 10 (10.31%) tumors were classified as grade III. Forty bitches were submitted to clinical staging (TNM) and 42.50% of the bitches received staging in grade I and, 25% of the bitches staged in grade IV and V, with metastases. The HER2 expression, 13/99 samples (13.13%) received score +2, 19/99 (19.19%) score +1 and absence of marking (score 0) was identified in 67 samples (67.80%). Immunostaining in hyperplastic or normal epithelial cells was evidenced, often in association with weak or moderate cytoplasmic labeling. Of the samples expressing +2 score for HER2 (n = 13), eight samples (17.39%) were complex carcinoma and five (9.80%) simple carcinomas. There was no relationship between HER2 immunostaining with age, tumor size, TNM, histological type, histological gradation, lymph node metastasis and distance. Animals with lymph node metastasis, as well as those diagnosed with distant metastasis, did not present HER2 expression in the tumors.

Discussion: The simple carcinoma seems to be the most frequent type histological diagnosed in canine mammary carcinomas, followed by carcinoma in mixed tumor and complex carcinoma. Tubulopapillary carcinomas are more invasive in the female dogs as well as in the woman. Carcinomas grade I and II are more frequent and present a better prognosis for the dog. However, bitches with grade III carcinoma survived for a shorter time when compared to dogs with grade I or II tumors. A factor that may have contributed to the lower number of bitches at worst prognostic stage (EC IV and V) is the current owners' awareness that they have sought veterinary help earlier, as soon as they detect small nodules in mammary gland. Overexpression of HER2 in women breast cancer is diagnosed in 20-30% of cases, whereas in bitches, this expression is variable. Also the different percentages of canine HER2 immunostaining are due to the lack of standardization for the analysis of the immunostaining, the immunohistochemical techniques employed and the non-specificity of the HER2 antibody. In canine mammary carcinomas the HER2 expression is low and this immunostaining is not related to other established prognostic factors. This study reinforces the hypothesis put forward by other authors that in the bitch the expression of HER2 may not be related to malignancy and tumor progression.

Keywords: dog, human epidermal growth factor receptor, mammary tumours, immunohistochemistry.

Descritores: cão, receptor do fator de crescimento epidérmico humano, tumores de mama, imunohistoquímica.

Received: 12 November 2016

Accepted: 28 April 2017

Published: 9 June 2017

Laboratório de Patologia Animal, Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV), Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG, Brazil.
CORRESPONDENCE: N.P. Soares [nicolle.pereira@hotmail.com - Tel.: +55 (34) 3291-8432]. Laboratório de Patologia Animal, Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV), Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias - UFU. Rua Ceará, s/n. Bloco 2D. Campus Umuarama. CEP 39408-902 Uberlândia, MG, Brazil.

INTRODUÇÃO

Os tumores mamários são as neoplasias mais comuns em cadelas [27] sendo que mais de 75% dos casos são considerados malignos [5,20]. As neoplasias de mama de cadelas constituem um grupo heterogêneo de tumores quanto aos padrões histológicos e comportamento biológico [25,33] o que torna mais complexo e urgente a identificação de fatores de prognóstico e preditivos [24] que possibilitem diagnosticar e tratar de forma mais eficaz animais portadores de tumor de mama [28].

O receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor type 2 - HER2) é uma glicoproteína de membrana da família tirosina-quinase, codificada por um gene de mesmo nome [15]. Na mulher, a expressão de HER2 em câncer de mama é diagnosticada em 20 a 30% dos carcinomas de mama [11] e está associado a um pior prognóstico, maior taxa de recorrência e mortalidade [36].

Na cadela, a superexpressão de HER2 em tumores mamários caninos (TMC) ainda é controversa [4,22]. Estudos prévios que investigaram o papel do HER2 nos TMC com emprego da imunohistoquímica não são consensuais, com resultados de imunopressão em tumores malignos variando de 19,1 a 48% [6,12,15,29,31]. Além disso, seu valor prognóstico permanece incerto [6,8,11,15,26].

Apesar do HER 2 ser importante biomarcador terapêutico e de prognóstico do câncer de mama em mulheres, sua relevância ainda não é bem estabelecida em tumores mamários de cadelas [4]. Dessa forma, objetivou-se verificar a expressão de HER2 em carcinomas mamários de cadelas e relacioná-la com o tipo e grau histológico, idade das cadelas, metástase em linfonodos e à distância, tamanho tumoral e estadiamento clínico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram incluídas neste estudo 99 amostras de mama provenientes de 90 cadelas diagnosticadas com carcinoma no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. Os critérios de inclusão foram: cadelas com exame clínico detalhado, exame radiográfico de tórax para pesquisa de metástase pulmonar e que foram submetidas ao tratamento cirúrgico de exérese de tumor de mama (mastectomia unilateral ou bilateral total). Foram excluídas do estudo cadelas com histórico de uso de fármacos que pudessem interferir com o desenvolvimento tumoral (drogas anti neoplásicas, anti-inflamatórios).

O estadiamento clínico (TNM) foi realizado conforme a Organização Mundial da Saúde (OMS) [21,35]. Os fragmentos de cada tumor mamário e de linfonodos regionais retirados cirurgicamente, foram fixados em formol tamponado 10%, submetidos ao processamento histológico para confecção de lâminas de microscopia coradas em hematoxilina e eosina (HE). A avaliação histológica foi atribuída por dois patologistas e as neoplasias mamárias foram classificadas de acordo com os tipos histológicos [17] e gradação histológica [7].

As amostras de carcinomas mamários foram submetidas à imunohistoquímica [3,12]. A recuperação antigênica por calor foi realizada em micro-ondas na potência alta (720 W) por 15 min em solução ácido etilenodiamino tetra-acético dissódico (EDTA) 10 mM, pH 9. Em seguida, as lâminas foram resfriadas em água corrente por 20 min. Para o bloqueio de peroxidase endógena utilizou-se água oxigenada 10 V, 10 banhos de 3 min cada.

O anticorpo anti HER2 monoclonal (Anticorpo anti HER2 monoclonal SP3- SAB5500080)¹ foi diluído 1:400 em soro albumina bovina (BSA) 1%. Os cortes receberam 100 µL do anticorpo e foram incubados por 18 h, 4°C em câmara úmida. Após incubação as lâminas foram lavadas com solução TRIS tampão (2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol) e utilizou-se a técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase (Complexo estreptavidina-peroxidase K069011 - LSAB + HRP (rabbit/mouse/goat)². A reação foi revelada com diaminobenzina (Diaminobenzina - DAKO- K3468, DAB)², as lâminas foram contra coradas com Hematoxilina de Harris por 2 min e montadas.

Como controle positivo da reação, utilizou-se corte histológico de carcinoma mamário de mulher previamente testado para expressão de HER2 e com escore +3 [2]. Como controle negativo, substituiu-se o anticorpo primário pelo diluente do anticorpo (BSA 1%).

A expressão de HER 2 foi determinada por análise semi quantitativa, realizada a partir da verificação da marcação da membrana das células epiteliais, conforme escore recomendado pelo HerceptTestTM (Dako). O escore +3 foi atribuído no caso de imunomarcação intensa, uniforme e completa de membrana plasmática em mais de 80% das células epiteliais da amostra tumoral. No escore +2 observou-se imunomarcação completa ou incompleta de membrana, em mais de 10% de células epiteliais neoplásicas. O escore +1 foi atribuído no caso de marcação fraca e incompleta de membrana

plasmática, em pelo menos 10% de células epiteliais, e o escore 0 quando não houve marcação de membrana plasmática. As imunomarcações de secreções luminal, em epitélio normal e acúmulos extracelulares na amostra do tecido foram desconsideradas. Os tumores com escore +3 e +2 foram considerados positivos.

Relacionou-se estatisticamente a expressão de HER2 com o tipo histológico do tumor mamário, sendo que os carcinomas foram agrupados em simples (tubulopapilar, sólido e anaplásico) e complexos. Avaliou-se também a relação da expressão de HER2 e a idade, o estadiamento clínico, o grau histológico, o tamanho tumoral, metástase regional e metástase à distância.

Quanto à análise estatística, a relação entre expressão de HER2 e tipo de carcinoma (simples e complexo) e os tipos individuais de carcinomas mamários foi determinada pelo teste Qui-quadrado (χ^2) por meio do programa Action 2.5 em Microsoft Excel 2007. Ainda, utilizou-se o teste Qui quadrado ($P < 0,05$) para avaliar a relação entre tipos de carcinomas

com o estadiamento clínico, grau de malignidade, tamanho tumoral e metástase regional com o escore de marcação na IHQ. Por fim, utilizou-se o teste de Mann Whitney para verificar a relação entre a grau histológico dos carcinomas e o escore de marcação por HER2 ($P < 0,05$).

RESULTADOS

A idade das 90 cadelas com tumores mamários variou de quatro a 17 anos, com média de $10,03 \pm 2,84$ anos. A maior distribuição dos pacientes foi entre 8 e 13 anos.

Das 99 amostras de carcinomas mamários de cadelas, 51(51,51%) foram diagnosticadas como carcinoma simples, 46(46,47%) como carcinoma complexo (Figura 1A) e 2(2,02%) carcinoma *in situ*. Quanto aos tipos histológicos, o carcinoma tubulopapilar (Figura 1B) foi o tipo mais frequente de carcinoma simples, diagnosticado em 74,50% das amostras, seguido do carcinoma sólido (23,54%) e o anaplásico (1,96 %) [Tabela 1].

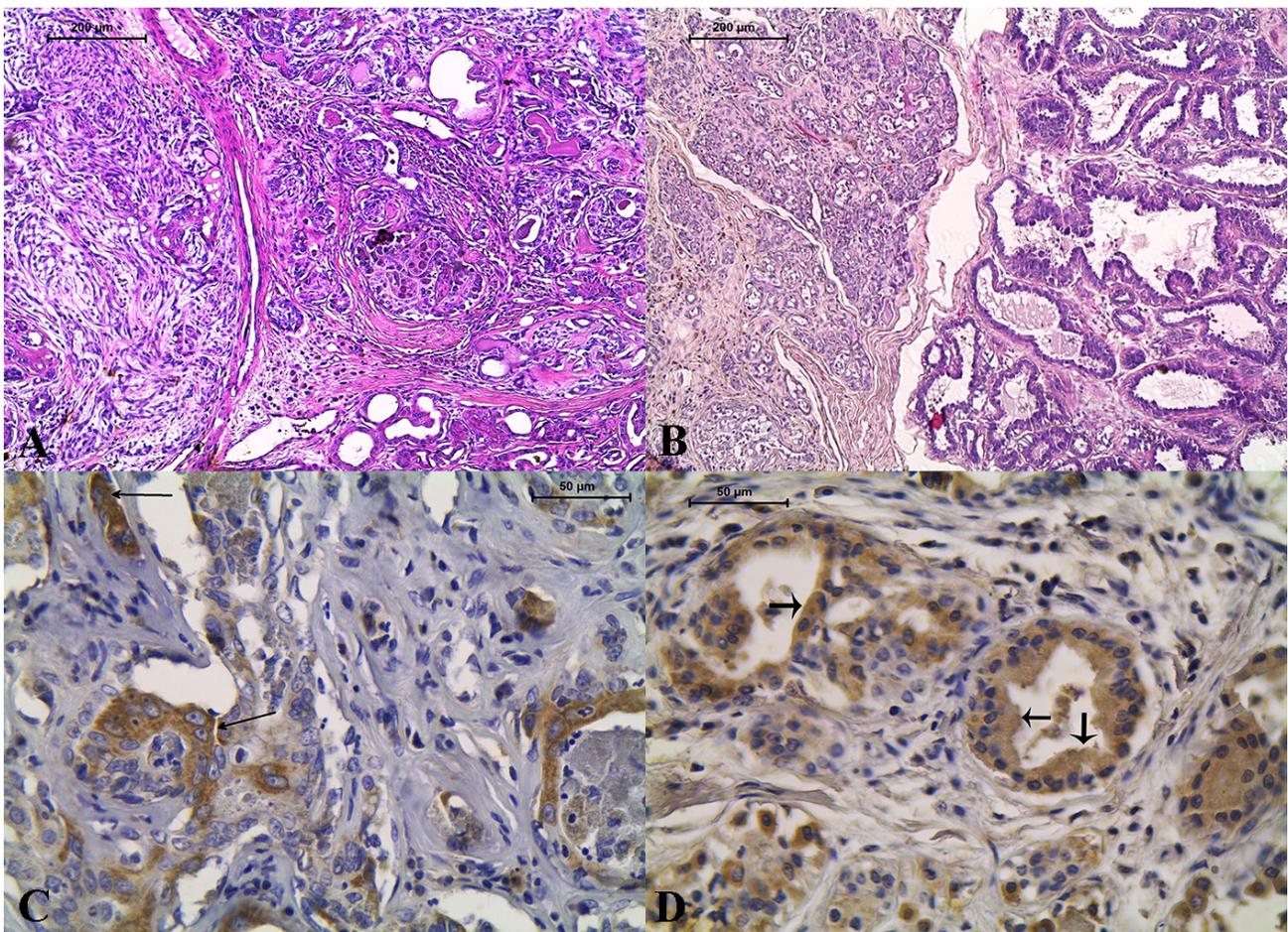


Figura 1. Fotomicrografias de carcinoma complexo e tubulopapilar em mama de cadela. A- Carcinoma complexo mamário, hematoxilina e eosina (HE), [100X]. Notar células epiteliais neoplásicas organizadas ora em túbulos, ora em feixes e tecido mioepitelial proliferado. B- Carcinoma tubulopapilar mamário. [HE, 100X]. Notar células epiteliais atípicas, com moderado pleomorfismo, organizadas em túbulos. C- Imunomarcação para HER2 pela técnica de imunohistoquímica em carcinoma complexo. Notar grupo de células epiteliais neoplásicas em formação tubular imunomarcadas para HER2 escore +2 (seta). [100x, contra coloração, Hematoxilina de Harris]. D- Carcinoma tubulopapilar, imunomarcação HER2 escore +2, [100X, contra coloração hematoxilina].

Tabela 1. Frequência dos tipos histológicos de carcinomas mamários de cadelas de acordo com grau histológico.

Tipo Histológico	Grau			n	%
	I	II	III		
Carcinomas simples				51	51,51
carc. anaplásico	0	0	1	1	
carc. sólido	2	5	5	12	
carc. tubulopapilar	17	19	2	38	
Carcinoma complexo	18	26	2	46	46,47
Carcinoma <i>in situ</i>	-	-	-	2	2,02
Total				99	100

Tabela 2. Características clinicopatológicas de cadelas com neoplasia mamária e relação com os escores de imunomarcção de HER2.

Característica clinicopatológica	n	HER2 0/ +1	HER2 +2	P
Idade (n = 90)				0,09
<10 anos	37	27 (72,97%)	10 (27,03%)	
≥10 anos	53	51 (96,23%)	2 (3,77%)	
Tamanho tumoral (n = 99)				0,13
<3cm	47	38 (80,85%)	9 (19,15%)	
3 a 5 cm	27	25 (92,59%)	2 (7,41%)	
> 5cm	25	23 (92%)	2 (8%)	
Estadiamento clínico (n = 40)				0,10
I, II e III	30	25 (83,33%)	5 (16,67%)	
IV e V	10	10 (100%)	0	
Tipos de carcinomas (n = 99)				0,69
Simples	51	46 (90,20%)	5 (9,80%)	
Complexos	46	38 (82,61%)	8 (17,39%)	
Carcinoma <i>in situ</i>	2	2 (100%)	0	
Gradação histológica (n = 99)				0,51
I	37	32 (86,49%)	5 (13,51%)	
II	50	42 (84%)	8 (16%)	
III	10	10 (100%)	0	
Metástase em linfonodo (n = 40)				0,43
Ausente	32	27 (84,38%)	5 (15,62%)	
Presente	8	8 (100%)	0	
Metástase a distância (n = 40)				0,54
Ausente	35	30 (85,71%)	5 (14,29%)	
Presente	5	5 (100%)	0	

O grau histológico foi atribuído a 97(97,98%) amostras de carcinomas, exceto o carcinoma *in situ* (n = 2), sendo que 37(38,14%) das neoplasias eram de grau I, 50(51,55%) grau II e apenas 10(10,31%) tumores foram classificados como grau III (Tabela 1).

Das 90 cadelas avaliadas, 40(44,44%) tiveram linfonodos inguinais, ipsilaterais à neoplasia mamária, retirados cirurgicamente. Verificou-se a presença de metástases em oito linfonodos (20%) e 32(80%) não apresentaram metástase em linfonodo inguinal.

A partir da avaliação da presença de metástases em linfonodos, estas 40 cadelas foram submetidas ao estadiamento clínico (TNM), sendo que 17(42,50%) apresentaram estadiamento clínico (EC) I, nove animais (22,50%) EC II, quatro cadelas (10%) EC III, cinco (12,50%) EC IV e cinco (12,50%) EC V (Tabela 2).

Quanto à expressão de HER2, 13/99 amostras (13,13%) receberam escore +2, 19/99(19,19%) escore +1 e ausência de marcação (escore 0) foi identificada em 67 amostras (67,80%). Nenhuma amostra de neoplasia mamária apresentou imunomarcacão +3 para HER2. Quanto aos tipos histológicos que expressaram HER2, 8/46(17,39%) amostras eram carcinoma complexo (Figura 1C) e 5/51(9,80%) carcinomas simples, sendo que, apenas os carcinomas tubulopapilares expressaram HER2 (Figura 1D). Imunomarcacão de membrana de células epiteliais hiperplásicas ou normais foram evidenciadas, muitas vezes em associação com fraca ou moderada marcação citoplasmática. Nenhuma imunomarcacão foi observada no componente mesenquimal, representado pelas células mioepiteliais contráteis, fibroblastos ou tecido conjuntivo.

Relacionou-se expressão de HER2 e com os fatores prognósticos: idade, tipo histológico, grau histológico, tamanho do tumor, presença de metástase em linfonodos e a distância e estadiamento clínico; sendo que não houve relação positiva entre a expressão de HER2 e os fatores prognósticos estudados (Tabela 2).

DISCUSSÃO

No presente trabalho, carcinomas simples, dentre eles, o carcinoma tubulopapilar, foram os tipos histológicos mais frequentes. Estudos prévios também relataram o carcinoma simples como o mais frequente, seguido do carcinoma em tumor misto e carcinoma complexo [26,30]. Na cadela, assim como na mulher, os carcinomas tubulares são mais invasores, enquanto que o carcinoma *in situ* e o carcinoma complexo tem os melhores prognósticos [18].

Quanto à gradação histológica, atribuída a 97 amostras de carcinomas mamários deste estudo, 51,55% das neoplasias eram grau II. Carcinomas em grau I e II são mais frequentes [22] e apresentam melhor prognóstico para a cadela [22] e cães com carcinoma grau III sobreviveram por tempo menor quando comparados com cães portadores de tumores grau I ou II [13].

Neste estudo, os carcinomas simples do tipo sólido apresentaram maior número de amostras com grau III. Estudos prévios [13] verificaram que cães com carcinomas simples apresentam pior prognóstico quando comparados com outros carcinomas, porém não verificaram diferença na sobrevida quando estes carcinomas apresentavam grau II ou III, ambos de pior prognóstico. Outros trabalhos demonstraram que carcinomas complexos, de grau I e II são mais frequentes e os cães com este tipo de carcinoma apresentavam bom prognóstico [13,32].

As cadelas deste relato, as quais os linfonodos foram avaliados, 20% dos linfonodos estavam comprometidos com metástases. Estes resultados são semelhantes a estudos anteriores, em que 29,5% das cadelas apresentaram envolvimento nodal [20]. A presença de metástases em linfonodos regionais influencia sobremaneira a sobrevida, com redução significativa da expectativa de sobrevivência de cadelas com carcinomas mamários, quando comparadas às cadelas sem metástase linfonodal [32].

Dentre os diversos fatores prognósticos em tumores mamários caninos estão o tamanho tumoral, a condição dos linfonodos e o estadiamento do paciente [14]. No presente estudo, a maioria das cadelas recebeu estadiamento no grau I (42,50%), ou seja, possuíam tumores menores que três centímetros e sem metástases em linfonodo regional ou à distancia; e 25% foram estadiadas em grau IV e V, ou seja, com metástases. Estudos anteriores avaliaram estadiamento clínico de cadelas com carcinomas mamários e identificaram 27,7% das cadelas na classificação TNM grau I e 36,6% no grau II [34].

Um fator que pode ter contribuído para o menor número de cadelas em estádios com pior prognóstico (EC IV e V) é a atual conscientização dos proprietários, que tem procurado por auxílio médico veterinário mais precocemente, assim que detectam pequenos nódulos na mama, como relatado em outros países [16,37].

Quanto à imunomarcacão de HER2 nas amostras de mama de cadelas do presente trabalho, 13,13% das mamas neoplásicas foram positivas conforme o escore +2. Nos carcinomas mamários de cadelas, o escore +2 para HER2 parece ser frequente, diagnosticado em 17,6% [15], 22% [26] e 91% [6] dos carcinomas.

Há divergência na interpretação da expressão de HER2 proposta pelo HercepTestTM e a Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) [36] assim

como, o Consenso e Diretrizes para padronização da identificação do HER2 em tumores mamários de cadelas [23]; os quais consideram HER2 positivas apenas as amostras de carcinomas mamários com escore +3. Porém, grande parte dos estudos sobre expressão de HER2 em tumores mamários de cadelas utiliza o sistema clássico de escore utilizado em câncer de mama humano, HercepTest™ [12,15,26].

A superexpressão de HER2 em câncer de mama em mulheres é diagnosticada em 20-30% dos casos (9), enquanto que nas cadelas, essa expressão é variável (13,6 a 48%) [2,12,15,29]. Na cadela, as variações nos percentuais de imunomarcção para HER2 deve-se à ausência de padronização para análise das imunomarcções e técnicas imunohistoquímicas empregadas [4,19].

Ou ainda, outro fator a ser avaliado é que na detecção da expressão de HER2 por métodos imunohistoquímicos, utiliza-se anticorpo anti-HER2 humano. Estudos anteriores confirmaram a reatividade cruzada entre os anticorpos contra proteínas anti-humanos e tecidos caninos [11,15,29]. Contudo a ausência de imunomarcção ou ainda, marcação de intensidade variável em carcinomas mamários de cadelas, assim como, a presença de marcações inespecíficas identificadas no citoplasma celular ou imunomarcção de células hiperplásicas ou normais dentro da amostra tumoral, sugerem a inespecificidade do anticorpo [4].

As neoplasias mamárias acometem principalmente cadelas adultas e idosas, com baixa incidência em animais menores que dois anos [18]. As médias de idade relatadas na literatura são 10,17 [34], 10,2 [27] e 10,6 [10], semelhantes à média observada nas cadelas desse estudo. Assim como na mulher, idade é considerada como um fator de risco para neoplasias mamárias em cadelas, sendo já verificado que a média de idade dos animais com tumores benignos era inferior a média dos animais com tumores malignos [33].

A ausência de relação entre o escore marcação de HER2 e o idade dos animais observada no presente estudo já foi relatado [11,26]. Por outro lado, há estudos que indicam maior expressão de HER2 em animais com idade superior a 9 anos [8]. Ainda, a partir do ponto de vista biológico, cães com 10 anos de idade correspondem a 56-60 anos em humanos [25], ou seja, a maior incidência de carcinomas mamários ocorre em cães idosos com idade de 7-10 anos, correspondente

a 44-56 anos em humanos. Sendo assim, os picos de incidência de tumores de mama em cadelas do presente trabalho e em mulheres são semelhantes, reafirmando a idade como fator de risco.

Estudos prévios com HER2 em tumores mamários de cadelas assim como no presente trabalho, não verificaram correlação entre tipo histológico e a imunomarcção de HER2 nos carcinomas mamários mistos [2,11]. Neoplasias mamárias de cadelas são consideradas heterogêneas quanto ao comportamento biológico e morfológico [33] e a imunomarcção de HER2 depende da sensibilidade do método de detecção molecular e da expressão gênica [10]. Acredita-se que na cadela, diferentemente na mulher, o HER2 desempenha função na formação tumoral, mas o desenvolvimento tumoral pode não estar diretamente associado à imunoexpressão de HER2 [11].

A gradação histológica, juntamente com a imunomarcção de HER2 em tumores mamários de cadelas, são consideradas fatores de prognóstico [12], entretanto neste estudo não foi observada relação entre estes dois fatores de prognóstico, assim como relatado em estudos anteriores [11].

Na cadela e na mulher, o tamanho também é, isoladamente, fator de prognóstico. Entretanto, no presente estudo não houve relação entre o escore de marcação de HER2 e o tamanho tumoral, assim como relatado anteriormente [1,11]. Na mulher, fatores como a existência ou a falta de receptores hormonais, diferentes tipos de receptores de crescimento epidérmico e genes supressores de tumor podem influenciar o tamanho tumoral [8,9]. Acredita-se que fenômenos semelhantes possam ocorrer nas cadelas em relação ao tamanho tumoral [1].

No câncer de mama em mulheres há controvérsias sobre a relação metástase em linfonodos e expressão de HER2 [22]. O mesmo parece ocorrer em cadelas, onde há estudos que indicam que a expressão de HER2 em animais com metástase linfonodal varia de 22,86% a 40% [10] e, por outro lado, outros estudos não verificaram relação positiva entre a expressão de HER2 e o envolvimento linfonodal [11,26].

Não houve relação entre a imunomarcção de HER2 e a presença de metástase à distância, assim como relatado em estudo anterior [11]. Estes autores [11] analisaram o tempo de vida das cadelas, um ano após a cirurgia de mastectomia, e verificaram que aquelas cadelas com metástase à distância, mesmo

sem a expressão HER2 apresentaram menor tempo de sobrevivência.

CONCLUSÃO

A imunomarcagem de HER2 em carcinomas mamários de cadelas é baixa e não apresenta relação com fatores de prognóstico como tamanho tumoral, tipo e gradação histológica, TNM, envolvimento nodal e metástases à distância. Este estudo reforça a hipótese aventada por outros autores de que na cadela a expressão de HER2 pode não estar relacionada com a malignidade e progressão tumoral.

MANUFACTURERS

¹Sigma- Aldrich. St. Louis, MO, USA.

²DAKO North America Inc. Carpinteria, CA, USA.

Funding. This research was supported by Uberlândia Federal University, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and FAPEMIG .

Ethical Approval. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de ética da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) conforme o processo CEUA/UFU 082/14.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 Almasri N.M. & Al Hamad M. 2005. Immunohistochemical evaluation of human epidermal growth factor receptor 2 and estrogen and progesterone receptors in breast carcinoma in Jordan. *Breast Cancer Research*. 7(5): 598-604.
- 2 Bertagnolli A.C., Ferreira E., Dias E.J. & Cassali G.D. 2011. Canine mammary mixed tumours: immunohistochemical expressions of EGFR and HER-2. *Australian Veterinary Journal*. 89(8): 312-317.
- 3 Beselga A.G. 2013. Avaliação da expressão do recetor HER-2 em carcinomas mamários caninos. 91f. Lisboa. Dissertação (Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa.
- 4 Burrai G.P., Tanca A., De Miglio M.R., Abbondio M., Pisanu S., Polinas M., Pirino S., Mohammed S.I., Uzzau S., Addis M.F. & Antuofermo E. 2015. Investigation of HER2 expression in canine mammary tumors by antibody-based, transcriptomic and mass spectrometry analysis: is the dog a suitable animal model for human breast cancer? *Tumour Biology*. 36(11): 9083-9091.
- 5 Cassali G.D., Lavallo 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., Bastchinski K., Terra E.M., Salvador R.C.L., Jark P.C., Delecrodi J.D.R., Nascimento N.A., Silva D.N., Silva L.P., Ferreira K.C.R.S., Frehse M.S., di Santis G.W., Silva E.O., Guim T.N., Kerr B., Cintra P.P., Silva F.B.F., Leite J.S., Mello M.F.V., Ferreira M.L.G., Fukumasu H., Salgado B.S. & Torres R. 2014. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors - 2013. *Brazilian Journal Veterinary Pathology*. 7(2): 38-69.
- 6 Dutra A.P., Granja N.V.M., Schmitt F.C. & Cassali G.D. 2004. c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. *Brazilian Journal Medical Biology Research*. 37(11): 1673-1681.
- 7 Elston C.W. & Ellis I.O. 1991. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 19(5): 403-410.
- 8 Gama A., Paredes J., Gärtner F., Alves A. & Schmitt F. 2008. Expression of E-cadherin, P-cadherin and beta-catenin in canine malignant mammary tumours in relation to clinicopathological parameters, proliferation and survival. *Veterinary Journal*. 177(1): 45-53.
- 9 Goldhirsch A., Wood W.C., Coates A.S., Gelber R.D., Thürlimann B. & Senn H.-J. 2011. Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *Annals of Oncology*. 22(8): 1736-1747.
- 10 Guimarães M.J.G. 2012. Pesquisa da Interação entre a Expressão do EGFR e da COX-2 nos tumores de mama de cadela. 71f. Alto Douro. Dissertação (Dissertação de Mestrado em Oncologia) - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto.
- 11 Hsu W.L., Huang H.M., Liao J.W., Wong M.L. & Chang S.C. 2009. Increased survival in dogs with malignant mammary tumours overexpressing HER-2 protein and detection of a silent single nucleotide polymorphism in the canine HER-2 gene. *Veterinary Journal*. 180(1): 116-123.

- 12 **Im K.S., Kim N.H., Lim H.Y., Kim H.W., Shin J.I. & Sur J.H. 2014.** Analysis of a new histological and molecular-based classification of canine mammary neoplasia. *Veterinary Pathology*. 51(3): 549-559.
- 13 **Karayannopoulou M., Kaldrymidou E., Constantinidis T.C. & Dessiris A. 2005.** Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. *Journal of Comparative Pathology*. 133(4): 246-252.
- 14 **Lavalle G.E., Bertagnolli A.C., Tavares W.L.F. & Cassali G.D. 2009.** Cox-2 expression in canine mammary carcinomas correlation with angiogenesis and overall survival. *Veterinary Pathology*. 46(6): 1275-1280.
- 15 **Martín de las Mulas J., Ordás J., Millán Y., Fernández-Soria V. & Ramón y Cajal S. 2003.** Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Breast Cancer Research and Treatment*. 80(3): 363-367.
- 16 **Millanta F., Calandrella M., Bari G., Niccolini M., Vannozzi I. & Poli A. 2005.** Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Research in Veterinary Science*. 79(3): 225-232.
- 17 **Misdorp W., Else R.W., Hellmen E. & Lipscomb TP. 1999.** In: *Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat*. 2nd edn. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, pp.1-59.
- 18 **Misdorp W. 2002.** Tumors of the Mammary Gland. In: Misdorp W. (Ed). *Tumors in Domestic Animals*. Ames: Iowa State Press, pp.576-606.
- 19 **Muhammadnejad A., Keyhani E., Mortazavi P., Behjati F. & Haghdoost I.S. 2012.** Overexpression of her-2/neu in malignant mammary tumors; translation of clinicopathological features from dog to human. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 13(12): 6415-6421.
- 20 **Oliveira Filho J.C., Kommers G.D., Masuda E.K., Marques B.M.F.P.P., Figuera R.A., Irigoyen L.F. & Barros C.S.L. 2010.** Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 30(2): 177-185.
- 21 **Owen L.N. 1980.** *TNM Classification of Tumours in Domestic Animal*. Geneva: World Health Organization, 53p.
- 22 **Peña L., De Andrés P.J., Clemente M., Cuesta P. & Pérez-Alenza M.D. 2013.** Prognostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with two-year follow-up: relationship with clinical and histological characteristics. *Veterinary Pathology*. 50(1): 94-105.
- 23 **Peña L., Gama A., Goldschmidt M.H., Abadie J. Benazzi C., Castagnaro M., Díez L., Güartner F., Hellmén E., Kiupel M., Millán Y., Miller M.A., Nguyen F., Poli A., Sarli G., Zappulli V. & Martín de las Mulas J. 2014.** Canine Mammary Tumours: A review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype assessment using immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*. 51(1): 127-145.
- 24 **Peña L., Nieto A.I., Pérez-Alenza D., Cuesta P. & Castaño M. 1998.** Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 10(3): 237-246.
- 25 **Queiroga F.L., Raposo T., Carvalho M.I., Prada J. & Pires I. 2011.** Canine Mammary Tumours as a model to study human breast cancer: most recent findings. *In Vivo*. 25(3): 455-465.
- 26 **Ressel L., Puleio R., Loria G.R., Vannozzi I., Millanta F., Caracappa S. & Poli A. 2013.** HER-2 expression in canine morphologically normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissues and its correlation with the clinical outcome. *Research in Veterinary Science*. 94(2): 299-305.
- 27 **Ribeiro L.G.R., Damasceno K.A., Neto J.M.C., D'Assis M.J.M.H., Costa A.T., Silva N.S., Aguiar P.H.P., Cassali G.D. & Estrela-Lima A. 2009.** Expressão da COX-2 nos carcinomas mamários de cadelas. *Veterinária em Foco*. (2): 134-139.
- 28 **Rivera P. & von Euler H. 2011.** Molecular biological aspects on canine and human mammary tumors. *Veterinary Pathology*. 48(1): 132-146.
- 29 **Rungsipipat A., Tateyama S., Yamaguchi R., Uchida K., Miyoshi N. & Hayashi T. 1999.** Immunohistochemical analysis of c-yes and c-erbB-2 oncogene products and p53 tumor suppressor protein in canine mammary tumors. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 61(1): 27-32.
- 30 **Santos A.A., Lopes C.C., Ribeiro J.R., Martins L.R., Santos J.C., Amorim I.F., Gärtner F. & Matos A.J. 2013.** Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. *Veterinary Research*. 9(1): 1-11.
- 31 **Sassi F., Benazzi C., Castellani G. & Sarli G. 2010.** Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. *Veterinary Research*. 6(5): 1-9.

- 32 Sorenmo K. 2003. Canine mammary gland tumors. *Journal of Small Animal Practice*. 33(3): 573-596.
- 33 Sorenmo K.U., Rasotto R., Zappulli V. & Goldschmidt M.H. 2011. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Veterinary Pathology*. 48(1): 85-97.
- 34 Torfíbio J.M.M.L., Lima A.E., Martins Filho E.F., Ribeiro L.G.R., D'Assis M.J.M.H., Teixeira R.G., Damasceno K.A., Cassali G.D. & Costa Neto J.M. 2012. Clinical characterization, histopathologic diagnosis and geoprocessing of mammary tumours in bitches from the city of Salvador, Bahia State. *Revista Ceres*. 59(4): 427-433.
- 35 Withrow S.J., Page R., Vail D.M., Sorenmo K.U., Deanna R.W. & Goldsmidt M.H. 2013. *Tumors of the mammary gland*. In: *Withrow & MacEwen's. Small Animal Clinical Oncology*. St. Louis: Elsevier Health Sciences, pp.538-556.
- 36 Wolff A.C., Hammond M.E.H., Schwartz J.N., Hagerty K.L., Allred D.C., Cote R.J., Dowsett M., Fitzgibbons P.L., Hanna W.M., Langer A., McShane L.M., Paik S., Pegram M.D., Perez E.A., Press M.F., Rhodes A., Sturgeon C., Taube S.E., Tubbs R., Vance G.H., Vijver M.V., Wheeler T.M. & Hayes D.F. 2007. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 25(1): 118-145.
- 37 Yamagami T., Kobayashi T., Takahashi K. & Sugiyama M. 1996. Influence of ovariectomy at the time of mastectomy on the prognosis for canine malignant mammary tumours. *Journal of Small Animal Practice*. 37(10): 462-464.

