

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E CLÍNICA DO CARCINOMA EM TUMOR
MISTO GRAU I “ATÍPICO” DA MAMA DE CADELAS E SUA CORRELAÇÃO COM
A SOBREVIDA**

MARCELA PRÓSPERO RODRIGUES PINTO

Salvador – BA

2020



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E CLÍNICA DO CARCINOMA EM
TUMOR MISTO GRAU I “ATÍPICO” DA MAMA DE CADELAS E SUA
CORRELAÇÃO COM A SOBREVIDA**

MARCELA PRÓSPERO RODRIGUES PINTO
Médica Veterinária

Salvador – BA

2020

MARCELA PRÓSPERO RODRIGUES PINTO

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E CLÍNICA DO CARCINOMA EM TUMOR
MISTO GRAU I “ATÍPICO” DA MAMA DE CADELAS E SUA CORRELAÇÃO
COM A SOBREVIDA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal nos Trópicos, da Universidade Federal da Bahia, como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal nos Trópicos.

Orientadora: Prof. Dra Alessandra Estrela-Lima

Co-orientadora: Dra. Karine Araújo Damasceno

SALVADOR-BA

2020

Caracterização morfológica, clínica e correlação com a sobrevida dos
carcinomas em tumores mistos grau I "atípicos" da mama de cadelas

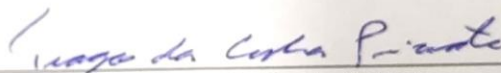
Marcela Próspero Rodrigues Pinto

Dissertação defendida e aprovada para obtenção do grau de
Mestra em Ciência Animal nos Trópicos

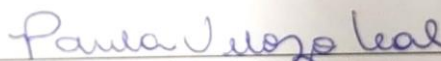
Salvador, 28 de fevereiro de 2020

Comissão examinadora:

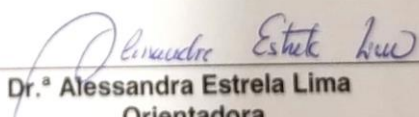
Dr.ª Angélica Cavalheiro Bertagnolli Rodrigues
IPVDF



Dr. Tiago da Cunha Peixoto
EMEVZ / UFBA



Dr.ª Paula Velozo Leal
EMEVZ / UFBA



Dr.ª Alessandra Estrela Lima
Orientadora
EMEVZ / UFBA

“É só não permitir que a maldade do mundo te pareça normal”

Kell Smith

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter guiado meus passos e por ter me dado força nos momentos de indecisão.

Agradeço aos meus pais, Ronaldo e Angela pelo apoio que dão para que eu possa a cada dia chegar mais longe.

Ao meu marido, João Paulo por apoiar minhas decisões ser compreensivo e também me acalmar quando estou angustiada. Te amo.

Agradeço a minha orientadora, Alessandra Estrela pela oportunidade de crescer e não ter desistido diante de tantas adversidades que passamos ao longo desses dois anos. Um exemplo de pessoa e de profissional. Muito obrigada pró.

À minha co-orientadora, por ter apostado no projeto e auxiliado ao longo de sua execução.

Aos membros do Núcleo de Pesquisa em Oncologia Mamária que me ajudaram com a coleta de dados, à equipe do LAPEX (FIOCRUZ-BA) pela disponibilidade com as instalações e equipamentos, em especial, a Isac Patrick Santos pela dedicação e paciência desde o início do meu mestrado.

Aos professores do LPV - UFBA, Prof. Tiago, Prof. Eduardo e Prof^a Paula, pelos aprendizados que nos passam e por fazerem do laboratório um ambiente de tanto carinho.

Aos estagiários, residentes, futuros residentes e pós-graduandos, Vitor, Thanielle, Lorena, Marilaine, Laís, Marília, Elaine, Sheila, Gabriel... sem vocês o dia a dia não teria a menor graça!!

À Carol pelo carinho, pelos desabafos e pela amizade que cresce a cada dia. Muito obrigada pelo apoio emocional, físico e empoeirado no projeto.

À Danielle e Humbertinho, não tenho palavras para expressar a minha gratidão. Vocês foram verdadeiros anjos ao longo desse projeto. São profissionais dos quais admiro muito e irmãos que amo demais. De verdade, muito obrigada!!

À Guga pelas análises estatísticas das quais sem você seria extremamente complicado.

Aos técnicos do LPV, Altemar, Williane, Seu Washington e a Dona Eva, das quais não deixam o laboratório sem movimento!! Dona Eva obrigada pelas várias lâminas cortadas!!!

Ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal nos Trópicos (PPGCAT), à FAPESB e CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

PINTO, M.P.R. **Caracterização morfológica e clínica do carcinoma em tumor misto grau I “atípico” da mama de cadelas e sua correlação com a sobrevida.** Salvador, 2020. 71p. Defesa (Mestre em Ciência Animal nos Trópicos) – Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal da Bahia, 2020.

O carcinoma em tumor misto é a neoplasia mamária maligna mais frequente em cadelas, e algumas características lhe conferem maior potencial de malignidade, a exemplo de áreas com padrão proliferativo micropapilar ou o maior grau histológico. Desta forma, objetivou-se com o desenvolvimento deste estudo, realizar a caracterização clínica, epidemiológica e anátomo-histopatológica dos carcinomas em tumores mistos, determinando quais características morfológicas contribuem para o comportamento “atípico” dos CTM Grau I com metástase nodal, a fim de comparar com os CTM grau II e correlacionar com as taxas de sobrevida. Foram selecionados 100 casos de carcinomas em tumores mistos (CTM) subdivididos com base na graduação histológica e comprometimento do linfonodo regional [(48 CTM I (-), 16 CTM I (+), 23 CTM (-), 13 CTM (+)]. Foram reavaliadas informações clínicas, epidemiológicas e histopatológicas referentes ao tumor mamário e do linfonodo regional. Verificou-se que em CTM I e CTM II, o tamanho do tumor e o tempo de detecção refletem no prognóstico das pacientes, CTM I (+) apresentam taxa de sobrevida baixa e características histopatológicas semelhante CTM II (+), como matriz mixóide associada a tecido maduro, arranjo papilar, inflamação linfocitoplasmocitária, maior desmoplasia e menor quantidade de vasos peri e intratumorais. Nas metástases nodais foi observado predominância de células neoplásicas isoladas, diferente da maioria dos casos, dos tumores primários. Conclui-se que para a avaliação fidedigna dos carcinomas em tumores misto, além do grau histopatológico, se faz necessário o estudo das células miopiteliais e possíveis adaptações no sistema de graduação, acrescentando características morfológicas que podem estar relacionados a maior agressividade tumoral como matriz extracelular, desmoplasia, presença e tipo de inflamação, angiogênese e invasão. Esse estudo contribui para a identificação de características preditivas de metástases em cadelas que apresentem CTM de baixo grau, porém de alta agressividade.

Palavras-chave: câncer de mama, cão, comportamento biológico, graduação histopatológica, potencial de malignidade.

ABSTRACT

PINTO, M.P.R. **Morphological and clinical characterization of carcinoma mixed tumor “atypical” grade I in female dogs and its correlation with survival.** 2020. 71p. Defesa (Mestre em Ciência Animal nos Trópicos) – Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal da Bahia, 2020.

Carcinoma in a mixed tumor is the most frequent malignant mammary neoplasia in female dogs, and some characteristics give it a greater potential for malignancy, such as areas with a micropapillary proliferative pattern or the highest histological grade. Thus, the objective of this study was to carry out the clinical, epidemiological and anatomic-histopathological characterization of carcinomas in mixed tumors, determining which morphological characteristics contribute to the “atypical” behavior of Grade I CMT with nodal metastasis. compare with CMT grade II and correlate with survival rates. We selected 100 cases of carcinomas in mixed tumors (CMT) subdivided based on histological grading and regional lymph node involvement [(48 CMT I (-), 16 CMT I (+), 23 CMT (-), 13 CMT (+) Clinical, epidemiological and histopathological information regarding the mammary and regional lymph node tumor was reevaluated. It was found that in CMT I and CMT II, the size of the tumor and the time of detection reflect on the patients' prognosis, CTM I (+) present a low survival rate and histopathological characteristics similar to CMT II (+), such as myxoid matrix associated with mature tissue, papillary arrangement, lymphohistioplasmocytic inflammation, greater desmoplasia and lesser number of peri and intratumoral vessels. , unlike most cases, of primary tumors. It is concluded that for the reliable evaluation of carcinomas in mixed tumors, in addition to the histopathological degree, it is necessary to study the myoepithelial cells and possible adaptations in the grading system, adding morphological characteristics that may be related to greater tumor aggressiveness such as extracellular matrix, desmoplasia, presence and type of inflammation, angiogenesis and invasion. This study contributes to the identification of predictive characteristics of metastases in bitches with low-grade but highly aggressive CMT

Keywords: breast cancer, dog, biological behavior, histopathological graduation, potential of the malignancy.

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Grupos experimentais divididos a partir da graduação histopatológica e presença ou ausência de metástase para linfonodo	29
Figura 2	Caracterização histopatológica do carcinoma em tumor misto mamário. Parênquima mamário. A-D. Fotomicrografia. A-B. Matriz mixoide no CTM I (-) e CTM II (-) (seta preta). C. Matriz mixoide no CTM I (+) (seta preta) e trabécula óssea (cabeça de seta). D. Matriz osteoide no CTM II (+) (cabeça de seta). Coloração HE, Objetiva 10x. E-F. Ilustração gráfica. Matriz mixoide e da matriz associada à tecido maduro nos subgrupos CTM I (-), CTM I (+), CTM II (-) e CTM II (+)	41
Figura 3	Caracterização histopatológica do carcinoma em tumor misto mamário. Parênquima mamário. A-D. Fotomicrografia. A. Proliferação de células neoplásicas em arranjo tubular no CTM I (-) (cabeça de seta). B-D. Proliferação de células neoplásicas em arranjo papilar no CTM II (-), CTM I (+) e CTM II (+) (seta preta). Coloração HE, Objetiva 10x. E. Ilustração gráfica. Arranjo papilar nos subgrupos CTM I (-), CTM I (+), CTM II (-) e CTM II (+)	42
Figura 4	Caracterização histopatológica do carcinoma em tumor misto mamário. Parênquima mamário. A-D. Fotomicrografia. A-B. Desmoplasia discreta no CTM I (-) e CTM II (-) (seta preta). C-D. Desmoplasia moderada a intensa no CTM I (+) e CTM II (+) (seta preta). Coloração HE, Objetiva 10x. E. Ilustração gráfica. Desmoplasias nos subgrupos CTM I (-), CTM I (+), CTM II (-) e CTM II (+)	43

- Figura 5 **Caracterização histopatológica do carcinoma em tumor misto mamário. Parênquima mamário. A-D. Fotomicrografia. A-B.** Infiltrado inflamatório linfocítico discreto no CTM I (-) e CTM II (-) (seta preta). **C-D.** infiltrado inflamatório linfocitoplasmocitário moderado a intenso no CTM I (+) e CTM II (+) (linfócito – cabeça de seta; macrófago - seta preta; plasmócito – seta vermelha). Coloração HE, Objetiva 40x. **E. Ilustração gráfica.** Infiltrado Inflamatório peri e intratumoral nos subgrupos CTM I (-), CTM I (+), CTM II (-) e CTM II (+) 45
- Figura 6 Características histomorfológicas em carcinomas em tumores mistos de mama de cadelas dos subgrupos CTM I (-), CTM I (+), CTM II (-) e CTM II, diagnosticadas pelo NPqOM – HOSPMEV / UFBA 48
- Figura 7 **Caracterização histopatológica do carcinoma em tumor misto mamário. Metástase em linfonodos.** Proliferação de células neoplásicas invadindo o parênquima nodal com variadas apresentações no arranjo. **A** – Sólido (seta preta). **B** - Tubular (seta preta). **C** - Células isoladas (seta preta). **D** - Papilar (seta preta). Coloração HE. Objetivas 40x 51
- Figura 8 Curva de sobrevivência das cadelas acometidas por carcinomas em tumores mistos dos grupos I e II, com e sem metástase para linfonodo, diagnosticadas pelo NPqOM – HOSPMEV/UFBA..... 52

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Parâmetros epidemiológicos, clínicos e histomorfológicos avaliados nos 100 casos de carcinomas em tumores mistos de cadelas HOSPMEV/UFBA	29
Tabela 2	Média de idade das cadelas acometidas por carcinomas em tumores mistos dos grupos I e II, com e sem metástase para linfonodo, diagnosticadas pelo NPqOM – HOSPMEV/UFBA	32
Tabela 3	Frequência das raças acometidas por carcinomas em tumores mistos de cadelas dos grupos I e II, com e sem metástase para linfonodo, diagnosticadas pelo NPqOM – HOSPMEV/UFBA	33
Tabela 4	Parâmetros clínicos avaliados nos 100 casos de carcinomas em tumores mistos de cadelas dos grupos I e II, com e sem metástase para linfonodo, diagnosticadas pelo NPqOM – HOSPMEV/UFBA..	38
Tabela 5	Parâmetros histomorfológicos avaliados nos 100 casos de carcinomas em tumores mistos de cadelas dos grupos I e II, com e sem metástase para linfonodo, diagnosticadas pelo NPqOM – HOSPMEV/UFBA	49
Tabela 6	Características celular das metástases nodais dos carcinomas em tumores mistos de cadelas dos grupos I e II, com metástase para linfonodo, diagnosticadas pelo NPqOM – HOSPMEV/UFBA	51
Tabela 7	Análise univariada e multivariada dos parâmetros morfo-histopatológicos associados a sobrevida de cadelas acometidas por carcinomas em tumores mistos diagnosticadas pelo NPqOM – HOSPMEV/UFBA	53

LISTA DE ANEXOS

	Página
Anexo 1 Estadiamento clínico (TNM) de tumores mamários caninos modificado de Sorenmo et al. (2013)	69
Anexo 2 Graduação histológica de tumores de mama de acordo com Elston e Ellis (1991)	70
Anexo 3 Protocolo do Comitê de Ética em Experimentação Animal	71

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3 HIPÓTESE	17
4 REVISÃO DE LITERATURA	18
4.1 NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE CADELAS E FATORES PROGNÓSTICOS CLÁSSICOS	18
4.2 CARCINOMA EM TUMOR MISTO	20
4.2.1 Células mioepiteliais	22
4.3 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS NEOPLASIAS MAMÁRIAS	24
4.3.1 Desmoplasia	25
4.3.2 Sistema imunológico	25
5 MATERIAL E MÉTODOS	27
5.1 APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS.....	27
5.2 LOCAIS DE EXECUÇÃO.....	27
5.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	27
5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
6.1 PARÂMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS E EPIDEMIOLOGIA	32
6.2 PARÂMETROS HISTOMORFOLÓGICOS DOS CTMS GRAU I E II	39
7 CONCLUSÕES	55
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	56
9 REFERÊNCIAS	57
ANEXOS	69

1 INTRODUÇÃO

Dentre os tumores malignos da mama de cadelas, o carcinoma em tumor misto (CTM) é, atualmente, o mais frequente, correspondendo a cerca de 42% das neoplasias diagnosticadas nesta espécie (CASSALI, 2000; ESTRELA-LIMA et al., 2010; MISDORP et al., 1999; RIBEIRO et al., 2009; TORIBIO, 2012). Este tumor é classificado como misto e tem origem a partir da transformação maligna do componente epitelial do tumor misto benigno e pode apresentar crescimento *in situ* ou infiltrativo, evidenciado pela perda da continuidade das camadas mioepitelial e basal associado à invasão de células neoplásicas no estroma, ou ainda substituí completamente a lesão benigna pré-existente (CASSALI et al., 2014; DAMASCENO, 2012; MISDORP et al., 1999).

Os tumores mistos malignos da mama de mulheres são geralmente denominados carcinomas metaplásicos com produção de matriz (SAAD et al., 2017; SAAD et al., 2018) e apresentam importantes similaridades morfológicas com o carcinoma em tumor misto da cadela (CASSALI et al., 2012; GENELHU et al., 2007; MCMULLEN et al., 2019; SAAD et al., 2017; WARGOTZ; NORRIS, 1989).

Entretanto, o carcinoma metaplásico está associado a uma evolução desfavorável, com sobrevida máxima de cinco anos (WARGOTZ; NORRIS, 1990; TAKALA et al., 2019; POLAMRAJU et al., 2020) enquanto, o CTM com maior frequência apresenta baixo grau histológico e prognóstico favorável comparado a outros carcinomas mamários da cadela (CASSALI, 2000; DAMASCENO, 2012; ESTRELA-LIMA et al., 2010; MARTINS et al., 2002; PATEL et al., 2019; RIBEIRO et al., 2009; NUNES et al., 2019; RASOTTO et al., 2017).

Recentemente, estudos tem relatado características atípicas dos carcinomas em tumores mistos, o que lhe confere maior potencial de malignidade, mas apenas quando associados a áreas de padrão proliferativo micropapilares ou quando apresentam maior grau histopatológico (NUNES et al., 2019). Nos últimos anos, tem sido observado na rotina da oncologia mamária casos intrigantes de cadelas portadoras de CTMs grau I, mas que de forma controversa, possuem alto potencial metastático, cuja evolução, via de regra resulta no óbito do animal (dados não publicados). Neste estudo, os casos de carcinomas em tumores mistos, com baixo grau histopatológico, mas que evoluem para metástase e cursam com a baixa sobrevida das cadelas foram denominados de

“atípicos”.

A transformação ou mudança para um estado de maior malignidade no caso dos carcinomas em tumores mistos ainda é pouco conhecida (BERTAGNOLLI et al., 2011), assim como a origem dos componentes mesenquimais (PANDEY et al., 2011). Desta forma, diante da alta frequência dos CTMs grau I, da possibilidade de variação do seu potencial de malignidade, determinado por outros fatores que não apenas o grau histológico, se justifica a tentativa de identificar características clínicas, epidemiológicas, mas principalmente morfológicas que contribuam para a compreensão desse comportamento “atípico”, bem como propiciem a identificação do prognóstico de forma prática na rotina clínica e conseqüentemente melhor conduta terapêutica nesses casos (DE LAS MULAS et al., 2005; RAKHA; ELLIS, 2011; SARLI et al., 2002).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

✓ Determinar quais características morfológicas contribuem para o comportamento “atípico” dos carcinomas em tumores mistos grau I de cadela com metástase nodal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

✓ Avaliar características clínicas e epidemiológicas dos carcinomas em tumores mistos graus I e II, com e sem metástase para linfonodos.

✓ Comparar características histopatológicas dos carcinomas em tumores mistos graus I e II, com e sem metástase para linfonodos.

✓ Caracterização das metástases nodais dos carcinomas em tumores mistos graus I e II.

✓ Avaliar e comparar a taxa de sobrevivência em cadelas acometidas com carcinomas em tumores mistos graus I e II com e sem metástase para linfonodos.

✓ Avaliar quais características clínicas e morfológicas estão relacionadas com o risco de óbito nos animais acometidos com carcinoma em tumor misto Grau I com metástase para linfonodo.

3. HIPÓTESE

✓ O carcinoma em tumor misto (grau I) metastático possui predomínio do arranjo papilar e porção mesenquimal composta apenas por matriz fibrosa, fatores que justificam seu comportamento biológico mais agressivo “atípico”.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE CADELAS E FATORES PROGNÓSTICOS CLÁSSICOS

Os tumores mamários são as neoplasias mais frequentes tanto em mulheres quanto em cadelas e causam grande impacto na medicina veterinária (CASSALI, 2013), pois na espécie canina, representam 52% de todas as neoplasias, e em 90% dos casos são malignas (ESTRELA-LIMA et al., 2010).

Em cadelas, a maior incidência das neoplasias mamárias pode estar associada com a maior expectativa de vida dos animais e ao uso de progestágenos para controle do cio nas fêmeas (LANA et al., 2007; SCHNEIDER et al., 1969). No entanto, além das causas hormonais possui uma etiologia multifatorial, com influência de fatores genéticos, ambientais, nutricionais (ALENZA et al., 2000; CLEARY et al., 2010; SILVA et al., 2004).

Diante da frequência dos tumores de mama em cadelas, estudos são realizados a fim de padronizar o diagnóstico, definir o prognóstico e buscar a melhor conduta terapêutica, além de permitir que a espécie canina atue como modelo experimental comparativo, devido as semelhança clínico-patológicas com tumores nas mulheres (AL-MANSOUR et al., 2018; CASSALI, 2013).

A classificação histopatológica, o estadio clínico e o grau, assim como a correlação entre esses dados, têm sido utilizados como fatores prognósticos importantes, a fim de prever o risco de morte ou de recidiva e direcionar as terapias a serem instituídas (CASSALI, 2006). Dentre a avaliação dos fatores prognósticos se faz importante o uso do estadiamento de tumores mamários caninos, estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e baseado no Sistema TNM, o qual considera o tamanho da lesão primária (T), extensão de sua disseminação para os linfonodos regionais (N) e presença de metástases à distância (M), esses dados auxiliam o profissional no melhor planejamento terapêutico (CASSALI et al., 2014; OWEN, 1980).

Em tumores mamários de cadelas o estadio é estratificado da seguinte forma: em relação ao tamanho, T1 são tumores menores que 3,0 cm; T2 são aqueles entre 3,0 e 5,0 cm e T3 são tumores maiores que 5,0 cm. A disseminação dos linfonodos regionais são classificados em N0 quando não há comprometimento e N1 quando há, e

a metástase a distância em M0, quando ausente e M1, quando presente (SORENMO, 2003) (Anexo 1).

Em relação a graduação, historicamente o primeiro sistema utilizado para tumores mamários em mulheres foi o de Nottingham, estabelecido em 1973 e, posteriormente, modificado por Elston e Ellis, (1991). Nesse estudo, o sistema de escores foi utilizado para avaliar formação tubular (escore 1 quando presente em mais de 75% do tumor, escore 2 quando em 10 a 75% e escore 3 quando em menos de 10%); pleomorfismo nuclear (escore 1 quando discreto, escore 2 quando moderado e escore 3 quando havia marcada variação) e contagem de mitoses em 10 campos considerando a área do microscópio, também com escores de 1 a 3. Assim, somam-se os escores, e valores entre 3 a 5, 6 a 7 e 8 a 9 pontos, o tumor recebe o grau I, II e III, respectivamente. Esses resultados trouxeram evidências de que o grau histológico pode ser utilizado como parte de um indicador prognóstico (ELSTON; ELLIS, 1991) (Anexo 2).

Inicialmente, esse método para avaliação do pleomorfismo nuclear foi considerado subjetivo e não foi amplamente aceito, o que gerou diversos estudos de concordância entre patologistas especialistas no diagnóstico de neoplasias mamárias, reprodutibilidade e padronização do sistema de graduação, a fim de minimizar possíveis erros e garantir o correto prognóstico e tratamento (DALTON et al., 1994; DUNNE; GOING, 2001; ROBBINS et al., 1995).

Em cadelas, o método de graduação de Nottingham modificado por Elston e Ellis (1991) foi aplicado em um estudo com 85 pacientes acompanhadas por um período de dois anos para correlacionar o grau histológico com o aparecimento de metástase, sobrevida e prognóstico desses animais. Os autores observaram que esse sistema de graduação apresentava-se como um fator prognóstico confiável e que poderia ser utilizado de forma confiável na veterinária para indicação do tratamento pós cirúrgico (KARAYANNOPOULOU et al., 2005).

Desde então, o sistema de graduação de Nottingham modificado por Elston e Ellis (1991) tem sido frequentemente utilizado por patologistas e oncologistas veterinários como uma ferramenta para o refinamento do diagnóstico, definição do prognóstico e tratamento dos pacientes (CASSALI et al., 2014). No entanto, todos os sistemas de graduação de neoplasias mamárias, quando aplicados em tumores com componentes mioepiteliais, a exemplo do mioepitelioma maligno e do

carcinossarcoma, não fazem a avaliação desse tipo de população celular, e por isso a malignidade dos tumores produtores de matriz pode ser subestimada (RASOTTO et al., 2017).

Alguns marcadores moleculares podem ser utilizados como valor prognóstico, entre eles os receptores hormonais de estrogênio e progesterona, ciclooxigenases, índice de proliferação (Ki67), fator de crescimento epidérmico (EGFR) e moléculas de adesão como E-caderina e β -catetina, no entanto não são tão frequentes na rotina clínica (GAMA et al., 2008; GERALDES et al., 2000; RIBEIRO et al., 2009).

4.2 CARCINOMA EM TUMOR MISTO

A frequência dos tipos de tumores de mama de cadelas pode variar devido aos diferentes métodos de classificação histopatológica (CASSALI et al., 2014; GOLDSCHMIDT et al., 2011), o que torna conflitante a comparação de pesquisas clínico-epidemiológicas (AULER et al., 2011; CASSALI et al., 2017).

A maioria dos pesquisadores mostram que entre as neoplasias mamárias malignas mais comuns em cadelas, o carcinoma em tumor misto é o mais frequente e geralmente apresenta baixo grau histológico e prognóstico favorável comparado a outros carcinomas mamários (CASSALI, 2000; DAMASCENO, 2012; ESTRELA-LIMA et al., 2010; MARTINS et al., 2002; PATEL et al., 2019; RIBEIRO et al., 2009).

Em humanos, tumores mistos são mais frequentes em glândulas salivares e eram anteriormente descritos como carcinomas ex adenomas pleomórficos. Quando os tumores mistos malignos acometem a mama em mulheres são geralmente denominados como carcinomas metaplásicos com produção de matriz (SAAD et al., 2017; SAAD et al., 2018) e apresentam grandes similaridades clínico-patológicas e moleculares com os carcinomas em tumores mistos de mama em cadelas, dentre elas a alta heterogeneidade e diferenciação mesenquimal com formação condroide e osteoide (CASSALI et al., 2012; GENELHU et al., 2007; MCMULLEN et al., 2019; SAAD et al., 2017; WARGOTZ; NORRIS, 1989).

Nos carcinomas metaplásicos da mama de mulheres a diferenciação óssea é pouco frequente (LEE et al., 2008), porém há relatos de formações de células

osteoblásticas gigantes, e de matriz óssea tanto na mama quanto no sítio metastático, porém a natureza desse processo ainda não foi elucidada (PATEL; MASO, 1966).

Esse tipo de neoplasia na mulher está associado a uma evolução ruim, sobretudo se associados a grupos produtores de matriz ou com diferenciação escamosa, os quais geralmente apresentam fenótipo triplo negativo, ou seja, não respondem a ação hormonal de estrogênio, progesterona e ao fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER2), nesses casos a sobrevida global das pacientes é de até cinco anos (POLAMRAJU et al., 2020; TAKALA et al., 2019; WARGOTZ; NORRIS, 1990;).

Justamente pela heterogeneidade dos tumores de mama metaplásico na mulher, a histogênese é pouco conhecida, no entanto, acredita-se que a metaplasia observada nesses tumores tenha origem na conversão do componente carcinomatoso em sarcomatoso induzidos pelo processo de transição epitelial-mesenquimal (PINHO, 2017).

Atualmente, a denominação carcinomas em tumores mistos é utilizada para neoplasias que apresentam apenas o componente epitelial maligno, com perda das camadas mioepitelial ou basal ou ainda com invasão ao estroma, e o componente mesenquimal permanece benigno, com formação de matriz mixóide, cartilagem, osso ou tecido adiposo. (CASSALI et al., 2012; 2014; MISDORP et al., 1999).

Entretanto, nos cães a terminologia dos carcinomas em tumores mistos mamários passou por algumas mudanças, nas quais anteriormente eram denominadas de tumores mistos malignos e compreendiam os tumores com porções epiteliais e/ou mesenquimais malignas, desta forma, os carcinossarcomas eram comumente classificados como sinônimo. Além disso, a denominação carcinoma complexo era também empregada quando a formação de matriz não estava bem definida (MISDORP et al., 1999).

Apesar das dificuldades de realização de estudos clínico-epidemiológicos por conta das mudanças na classificação histológica ao longo do tempo, no Brasil, diferentes grupos de pesquisa demonstraram uma frequência acima de 50% de tumores malignos, destes destacam-se os carcinomas em tumores mistos ou carcinomas complexos, pois são considerados tipos histológicos diferentes (OLIVEIRA et al., 2003; OLIVEIRA FILHO et al., 2010; NUNES et al., 2019; RASOTTO et al., 2017; TORÍBIO et al., 2012).

Porém ambos são descritos em sua grande maioria como neoplasias de bom comportamento biológico, com acometimento em pacientes com estadio I e de excelente prognóstico, no entanto, deve-se realizar a distinção do grau dos carcinomas em tumores misto, visto que em casos de maior grau já lhe conferem maior malignidade ou “comportamento atípico” (NUNES et al., 2019; RASOTTO et al., 2017).

Sabe-se que os carcinomas em tumores mistos de cadelas se originam da transformação maligna do componente epitelial dos tumores mistos benignos (MISDORP et al., 2002), no entanto, essa transformação ou a mudança para um estado de maior malignidade ainda é pouco conhecida (BERTAGNOLLI et al., 2011).

4.2.1. Células mioepiteliais

A origem dos componentes dos tumores mistos (ou ainda denominado tumores complexos) é até o momento controversa, pois as células mioepiteliais apresentam funções ainda pouco exploradas, sabe-se que são responsáveis pela sinalização entre células, pela contração ductal, atuam como uma barreira natural física entre estroma e o lúmen de forma que mantém a arquitetura anátomo histológica da mama. (PANDEY et al., 2011).

Essa barreira física favorece sua atuação como supressor natural da invasão e metástase de uma neoplasia *in situ*, dessa forma, os carcinomas em tumores mistos podem apresentar, na maioria dos casos, um bom comportamento biológico visto que há o envolvimento apenas do componente epitelial (PANDEY et al., 2011), em especial se comparado aos carcinomas simples que são mais infiltrativos para vasos linfáticos e possuem maior potencial metastático (YAMAGAMI et al., 1996).

As células mioepiteliais também apresentam permeabilidade seletiva à pequenas moléculas, regulam a expressão de metaloproteinases, síntese de componentes da matriz extracelular e atuam como supressores de tumor pela indução das células tumorais à apoptose, bloqueio da angiogênese e da degradação da membrana basal (PANDEY et al., 2011).

A glândula mamária possui três fenótipos celulares: epitelial, basal e mioepitelial. Durante o processo de transformação de tumor misto benigno para um carcinoma em tumor misto, pode acontecer a perda destes fenótipos, bem como alterações moleculares como perda da expressão de genes supressores do tumor (p63,

Δ Np63) e das moléculas de adesão (E-caderina e β -catenina), superexpressão de HER2, ou os tumores mistos mamários de cadelas podem sofrer a influência de células troncos neoplásicas, com maior capacidade de diferenciação o que resulta na grande heterogeneidade dos tumores de mama (CASSALI et al., 2012; RAMALHO et al., 2006; SAAD et al., 2017).

A hipersecreção de metaloproteinases pelas células tumorais levam à mudanças no microambiente tumoral, tal como degradação de membrana basal, da matriz extracelular e das próprias células mioepiteliais que perdem sua atuação como barreira física, responsável por impedir o avanço das células epiteliais (GUDJONSSON et al., 2002; JONES et al., 2003; NGUYEN et al., 2000; PANDEY et al., 2011), porém se desconhece os mecanismos moleculares e sinalizadores que levam a diferenciação de fenótipo (DEUGNIER et al., 2002).

Uma das teorias aponta que a matriz mixoide presente nos tumores mistos é predominantemente produzida pelas células mioepiteliais decorrente da proliferação de células fusiformes mioepiteliais e/ou formação de matriz mixoide, que se diferencia posteriormente em tecido cartilaginoso. Isso sugere a transformação sequencial de mixoide em cartilagem, foi observado ainda que a expressão de proteoglicanos de matriz extracelular, como o versican, poderia estar envolvida na precocidade dessa transformação, o que leva a fenótipos mesenquimais de células mioepiteliais (ERDÉLYI et al., 2005; DAMASCENO et al., 2014; PANDEY et al., 2011).

Outra teoria sugere que a superexpressão do gene p63 está relacionada com a origem mioepitelial por meio do componente mesenquimal e a superexpressão de citoqueratina 5 (CK5) está associada com a formação de células epiteliais basais em função do componente epitelial (RAMALHO et al., 2006), ou ainda que os componentes do tumor misto possuem origem epitelial e estão provavelmente relacionados a uma diferenciação mioepitelial (SAAD et al., 2017).

Alguns resultados, apesar de pouco direcionados e que precisam de maior aprofundamento, também sugerem que a formação da cartilagem nos tumores mistos caninos seja resultante de um processo de transição epitelial para mioepitelial e mioepitelial para mesenquimal (formação condroide), o que fortalece a proposta de alteração fenotípica das células tumorais para uma característica que irá conferir maior motilidade (ERDÉLYI et al., 2005; HELLMÉN; LINDGREEN, 1989).

4.3 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS NEOPLASIAS MAMÁRIAS

Estudar as características clínico epidemiológicas e morfológicas de um tumor auxilia na compreensão do comportamento da neoplasia. Em mulheres, os carcinomas lobulares invasores e *in situ* foram avaliados e verificou-se que o tipo invasor apresentava forte correlação com o uso de tratamento hormonal pós menopausa, com arranjos histológicos variados, intenso pleomorfismo, alto índice mitótico, e com a perda de E-caderina, fatores associados com o pior prognóstico desse tumor (CHRISTGEN et al., 2016).

Na espécie canina, os aspectos morfológicos como arranjo das células epiteliais tumorais, baixo grau, baixo índice mitótico e frequência de necrose, assim como, a ausência de invasão vascular em carcinomas em tumores mistos estão relacionados com a menor agressividade e bom prognóstico da neoplasia (RIBEIRO et al., 2012). Em outros tipos histológicos de neoplasias mamárias de cadelas também pode-se confirmar que diversas covariáveis como idade, porte do animal, tamanho do nódulo, o próprio tipo histológico e tempo entre o diagnóstico e a cirurgia refletem significativamente no tempo de sobrevida das pacientes (DIAS et al., 2016), desta forma, esses estudos direcionam os médicos veterinários sobre a melhor terapia a ser instituída para os pacientes.

Um estudo desenvolvido sobre as características clínico patológicas de diferentes tumores produtores de matriz, mostrou que nos carcinomas em tumores mistos de cadelas o tamanho do tumor, tipo histológico, tempo de evolução, grau histopatológico, presença de metástase nodal e arranjo epitelial podem atuar como fatores prognósticos independentes (RAUBER, 2017).

Embora os carcinomas em tumores mistos apresentem em sua maioria (75%) um bom comportamento biológico, baixo grau e boa sobrevida global, um estudo recente demonstrou que em alguns casos podem ser observadas áreas de padrão proliferativo agressivo, representadas por áreas micropapilares e sólidas, com estes achados sugeriu-se que o arranjo epitelial poderia demonstrar um comportamento biológico “atípico” destes tumores, e conseqüentemente influenciar no prognóstico (NUNES et al., 2019).

Outro achado morfológico observado em tumores mistos e carcinomas em

tumores mistos de cadelas é a metaplasia óssea, que apesar de não ter sido relacionada com a agressividade tumoral, a relação com o padrão histológico permanece ainda incerta (AULER et al., 2011).

4.3.1. Desmoplasia

A desmoplasia observada nos tumores mamários tem sido estudada como parâmetro prognóstico, junto a outros fatores importantes na compreensão do ambiente tumoral e o conjunto de características que podem influenciar no comportamento individualizado da neoplasia (SOUZA et al., 2018; GUJAM et al., 2014; TOLEDO et al., 2018).

4.3.2. Sistema imunológico

O sistema imunológico e suas subpopulações atuam por uma série de sinalizações químicas para responder adequadamente diante de uma injúria e manter a homeostase do organismo (ONO, 2008), no entanto a atividade desregulada do sistema imune pode estar relacionada, por exemplo, a progressão tumoral (CHOW et al., 2014). Em carcinomas mamários, tanto da mulher quanto de cadelas, é observado que o infiltrado inflamatório linfocítico pode retardar ou auxiliar na progressão tumoral, e atua como importante fator prognóstico (HEYS et al., 2012; JOSHI et al., 2014; MANTOVANI et al., 2002; MONTEIRO et al., 2018; ONO, 2008).

Com isso, a intensidade, tipo populacional e estado de ativação das células inflamatórias presentes no microambiente tumoral que acompanham o tumor também atuam como biomarcador prognóstico e preditivo, das quais destacam-se as populações de linfócitos e macrófagos (KLIMP et al., 2002, ESTRELA-LIMA et al., 2010; VIEIRA-FILHO et al., 2018).

A subpopulação de linfócitos TCD8⁺ está relacionada ao pior prognóstico assim como os macrófagos ativados pela via alternativa, denominados macrófagos tipo 2, pois eles estão envolvidos na progressão tumoral (ESTRELA-LIMA et al., 2010; MONTEIRO et al., 2018; VIEIRA-FILHO et al., 2018).

O uso de marcadores moleculares mais específicos, tanto em neoplasias mamárias de mulheres quanto de cadelas, atuam como métodos adicionais para melhor diagnóstico e tratamento, além de explicarem comportamentos diferenciados de um mesmo tumor, no entanto a precisão e reprodutibilidades dos fatores morfológicos são

essenciais para garantir a identificação do prognóstico de forma prática na rotina clínica e conseqüentemente melhor conduta terapêutica (DE LAS MULAS et al., 2005; RAKHA; ELLIS, 2011; SARLI et al., 2002).

Apesar dos avanços das pesquisas em tumores mamários, ainda há poucos estudos na literatura sobre as características morfológicas e clínico-epidemiológicas dos carcinomas em tumores mistos, no que tange os diferentes comportamentos biológicos deste tipo tumoral. O que torna relevante identificar os casos “atípicos”, este termo aplica-se em situações consideradas incomuns, raras.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS

Este estudo foi realizado de acordo com os princípios éticos para uso de animais em experimentação e após aprovação pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CETEA/CEUA), da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia, sob o protocolo número 62/2019 (Anexo 3).

5.2 LOCAIS DE EXECUÇÃO

Para a realização do projeto foram utilizadas as bases físicas e a infraestrutura do Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) do Hospital de Medicina Veterinária Professor Renato Medeiros Netto (HOSPMEV) da Universidade Federal da Bahia (UFBA) e do Laboratório de Patologia Experimental (LAPEX) do Instituto Gonçalo Moniz / Fundação Oswaldo Cruz – Bahia (IGM/Fiocruz-BA).

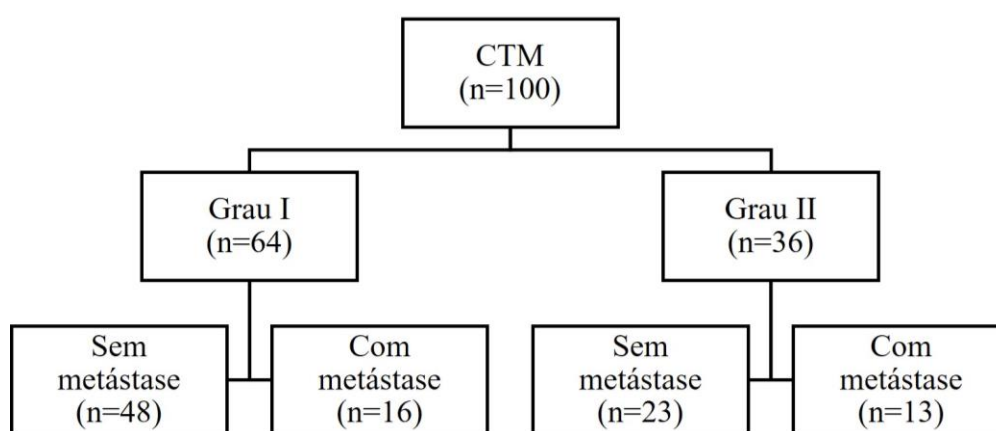
5.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram selecionados 100 casos com diagnóstico histopatológico de carcinoma em tumor misto (CTM), de um total de 1.046 casos de neoplasias mamárias em cadelas atendidos pelo Núcleo de Pesquisa em Oncologia Mamária (NPqOM) ou provenientes da rotina do Setor de clínica-cirúrgica do HOSPMEV. O estudo tem caráter retrospectivo no período de janeiro de 2009 a dezembro de 2017 e prospectivo, de janeiro de 2018 a dezembro de 2019.

A revisão dos casos selecionados foi realizada por dois patologistas veterinários, isoladamente, sem conhecimento prévio do diagnóstico anterior. Após a confirmação do diagnóstico, os casos foram divididos com base na graduação histopatológica em grau I e II [CTM I e (64) e CTM II (36)]. Em seguida, esses dois grandes grupos foram ainda subclassificados de acordo com a presença ou não de metástase em linfonodo: CTM I (-), CTM I (+), CTM II (-) e CTM II (+) (Figura 1). Os critérios para inclusão utilizados na seleção dos casos foram: diagnóstico histopatológico de carcinoma em tumor misto, sendo este o tumor com características mais agressivas nos casos de tumores múltiplos (CASSALI et al., 2014), cadelas submetidas mastectomia unilateral da primeira cadeia sem histórico prévio de neoplasia mamária na cadeia contralateral ou de outro tipo neoplásico, biópsia

excisional do linfonodo inguinal, grau histológico I e II com base no sistema Nottingham (ELSTON; ELLIS, 1991); dados referentes a avaliação do linfonodo,; fichas com preenchimento superior a 50% das características clínico-patológicas e material de reserva suficiente para processamento histológico. Os casos de CTM grau III não foram incluídos neste estudo, pela sua baixa frequência na rotina do LPV-UFBA, o que não favoreceu a constituição de um outro subgrupo para análise.

Figura 1: Grupos experimentais divididos a partir da graduação histopatológica e presença ou ausência de metástase para linfonodo.



Legenda: CTM = Carcinoma em Tumor Misto

Foram revisadas fichas clínicas, oncológicas e laudos histopatológicos de todos os animais selecionados, para obtenção de dados clínicos e epidemiológicos, como raça, idade, sexo, status reprodutivo da paciente, uso de progestágenos e pseudociese. Também foram coletadas informações relacionadas ao tempo de detecção da doença, características do tumor a exemplo da localização, tamanho, ulceração, metástase, bem como estadió clínico, tratamento quimioterápico e tempo de sobrevida.

O tempo de detecção da doença foi estabelecido pela data em que o tutor observou o nódulo pela primeira vez até o primeiro atendimento com o médico veterinário. A sobrevida global foi definida (em dias) como sendo o período entre a exérese cirúrgica do tumor primário e a data de óbito pela doença ou finalização deste estudo. O óbito pela doença foi confirmado após exame necroscópicos dos animais, com consentimento do tutor.

As características histopatológicas avaliadas, nas secções de tumor e linfonodo coradas pela Hematoxilina-Eosina incluíram: a determinação do arranjo histológico predominante (tubular, papilar), a tipo dos componentes mesenquimais predominantes (matriz mixóide, condróide, osteóide, associada ou não a tecido mesenquimal maduro), a contagem mitótica na porção epitelial em pelo menos cinco campos, presença ou ausência de áreas de necrose do estroma tumoral, presença ou ausência de desmoplasia, assim como sua intensidade (leve, moderada ou intensa) (KRUIJF et al., 2011), avaliação qualitativa da resposta inflamatória [tipo (ausente, linfocítica, macrofágica, linfoplasmocitária ou linfohistioplasmocitária), distribuição (focal, multifocal ou difusa) e intensidade ((leve, moderada ou intensa)], contagem de vasos peri e intratumorais (ausentes, até 25 vasos, 26 a 50 vasos e acima de 50 vasos) e formação capsular do tumor (presente ou ausente). Os casos de arranjo túbulo-papilar foram realocados pela predominância (maior que 50%) do arranjo, em tubular ou papilar. Com relação ao parênquima nodal foram avaliados o acometimento metastático, arranjo predominante das células metastáticas e a semelhança com o arranjo do tumor primário (Tabela 1). Para uma avaliação representativa, foi considerado o tamanho tumoral, até 5,0 cm e maior que 5,0 cm, e em seguida colhidos três ou cinco fragmentos representativos da massa tumoral, respectivamente, medindo cada 1,5 x 1,5 cm, selecionados de forma aleatória, mas com exclusão das áreas de necrose (SILVA-LIMA, 2011).

Tabela 1. Parâmetros epidemiológicos, clínicos e histomorfológicos avaliados nos 100 casos de carcinomas em tumores mistos de cadelas HOSPMEV/UFBA

Dados epidemiológicos e clínicos		Dados histomorfológicos	
Raça		Diagnóstico	Carcinoma em tumor misto
Idade		Gradação	I e II
Sexo		Arranjo	Tubular Papilar
Status reprodutivo	Castrada Inteira	Matriz	Mixóide; condroide; osteoide; mista*; matriz associada a tecido maduro; tecido maduro**
Uso de progestágenos	Sim Não	Mitoses	Contagem em 10 CAP Mitoses atípicas
Pseudociese	Sim Não	Necrose	Presente Ausente
Cadeia mamária acometida	Direita Esquerda Ambas	Desmoplasia (KRUIJF et al., 2011)	Presença Ausência Distribuição: focal, multifocal, difusa Intensidade: discreto, moderado, intenso
Localização	M1 e M2 M3 e M4 M5	Inflamação	Ausente, Linfocítica; Macrofágica; Linfohistiocitária ou Linfoplasmocitário; Linfohistioplasmocitária. Distribuição: focal, multifocal, difusa

			Intensidade: discreta, moderada, intensa
Ulceração	Sim Não	Contagem de vasos sanguíneo peri e intratumorais	Ausentes 1 a 25 vasos 26 a 50 vasos >50 vasos
Tempo de detecção	< 1 mês 1 a 6 meses 7 a 12 meses 1,1 a 3 anos >3anos	Formação capsular	Presente Ausente
Tamanho	Até 3,0 cm 3,1 a 5,0 cm >5,0 cm	Linfonodo	Arranjo células metastáticas (sólido, células isoladas, tubular e papilar) Semelhança com arranjo do tumor primário
Estadiamento	I, II, III, IV, V		
Metástase a distância	Sim Não		
Quimioterapia	Sim Não		

*Matriz mista: mixóide e condroide, mixoide e osteóide, mixoide, condóide e osteóide

**Tecido maduro: cartilagem, trabéculas ósseas, tecido mieloide

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados obtidos foram tabulados, coligidos, de forma ordenada e analisados estatisticamente para avaliação da correlação entre dados epidemiológicos, características morfológicas do tumor, fatores prognósticos clássicos e sobrevida.

Para avaliação paramétrica foram utilizados os testes exato de Fisher para verificar a significância de associações presuntivas entre variáveis categóricas que apresentavam informações, ANOVA e Kruskal-Wallis, quando comparados mais de dois grupos.

Para as análises univariada, pela correlação de Spearman buscou-se verificar quais fatores histo-morfológicos estavam relacionados com a sobrevida, e multivariadas e pela regressão logística binária. os dados foram agrupados, sempre que possível, de maneira dicotômica: tamanho do tumor (<3cm ou ≥3cm), ulceração (presente ou ausente), tempo de detecção do tumor (<6 meses ≥ 6 meses), constituição da matriz (sem tecido maduro ou associado à tecido maduro), arranjo epitelial (tubular ou papilar); formação capsular (presente ou ausente), tipo de infiltrado inflamatório peri e intratumoral (linfocitário, linfocitoplasmocitário), intensidade do infiltrado inflamatório (discreta ou moderada/intensa), contagem de vasos peritumorais e intratumorais (até 25 e maior que 25), desmoplasia abundante (não ou sim);

intensidade da desmoplasia estromal (discreta e moderada/intensa); necrose (presente ou ausente); média de mitose (≤ 1 ou > 1), metástase linfonodal (presente ou ausente).

As curvas de sobrevida foram geradas pelas estimativas de Kaplan-Meier, e em todos as avaliações, o valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. As análises foram realizadas com o auxílio dos softwares Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, EUA) ou SPSS 17 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 PARÂMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS E EPIDEMIOLOGIA

Com relação as informações clínicas e epidemiológicas, pôde-se observar que a faixa etária de acometimento mais frequente nas cadelas foi entre 10 e 12 anos, sendo a média de idade 9,76 e 11,13 anos observada nos grupos CTM I e CTM II, respectivamente. Estes resultados ratificam a maioria dos estudos, nos quais se observa maior acometimento por neoplasias mamárias em animais entre nove e 13 anos, raramente ocorrendo em animais jovens com menos de dois anos (COSTA JÚNIOR et al., 2016; NUNES et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2003; OLIVEIRA FILHO et al., 2010; RASOTTO et al., 2017).

No subgrupo CTM I (-) a idade variou de cinco a 18 anos, com média de 9,3 anos e 83,33% (40/48) dos animais com idade superior a oito anos; no subgrupo CTM I (+) a idade variou de sete a 15 anos com média de 10,8 anos e 68,75% (11/16) dos animais com idade superior a 10 anos; no subgrupo CTM II (-) a idade variou de seis a 16 anos com média de 11,60 anos e 60,86% (14/23) das cadelas com idade superior a 12 anos e no subgrupo CTM II (+) a idade variou de sete a 13 anos com média de 10,3 anos e 53,84% (7/13) de animais com idade superior a 11 anos.

Vale destacar que, os animais do subgrupo CTM I (-), de melhor prognóstico, apresentaram menor média de idade, e que os subgrupos com metástases, CTM I (+) e CTM II (+) apresentaram média de idade bastante semelhantes. No entanto, não é descrita na literatura uma relação entre a idade de acometimento e a prognóstico (PHILIBERT et al., 2003). Os dados referentes a média de idade podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2 - Média de idade das cadelas acometidas por carcinomas em tumores mistos dos grupos I e II, com e sem metástase para linfonodo, diagnosticadas pelo NPqOM – HOSPMEV/UFBA.

Grupos	CTM I (-) (n=48)	CTM I (+) (n=16)	CTM II (-) (n=23)	CTM II (+) (n=13)
Média de idade (anos)	9,34	10,87	11,60	10,30
	n=64 9,76		n=36 11,13	

Legenda: CTM I / II: carcinoma em Tumor Misto grau I ou II, (-): sem metástase para linfonodo, (+): com metástase para linfonodo, n: número total de casos no grupo ou subgrupo.

Animais sem raça definida seguidos de cadelas das raças Poodle e Pinscher foram mais frequentemente acometidos por tumores mamários, independente do subgrupo (Tabela 3). Tais resultados também foram observados em estudos anteriores realizados no Brasil (D’ASSIS, 2017; CAVALCANTI; CASSALI, 2006; FURIAN et al., 2007; ESTRELA-LIMA et al., 2010; TORÍBIO et al., 2012; RIBEIRO, 2012; LAVALLE et al., 2012; VIEIRA-FILHO, 2015; MACHADO et al., 2018; CONCEIÇÃO, 2017). Em outros países como Itália, há maior prevalência de raças Pastor Alemão e Yorkshire (RASOTTO et al., 2017; SARLI et al., 2002). Contudo, segundo Peleteiro (1994) e Cassali e colaboradores (2014) ainda não existem subsídios que possibilitem inferir sobre predisposição racial para o desenvolvimento de tumores mamários na cadela.

Tabela 3 - Frequência das raças acometidas por carcinomas em tumores mistos de cadelas dos grupos I e II, com e sem metástase para linfonodo, diagnosticadas pelo NPqOM – HOSPMEV/UFBA

Raças	CTM GRAU I				CTM GRAU II			
	(-) n=48		(+) n=16		(-) n=23		(+) n=13	
	Total de casos	%	Total de casos	%	Total de casos	%	Total de casos	%
SRD	13	27,08	1	6,25	7	30,43	5	38,46
Poodle	8	16,66	12	75,0	11	47,82	4	30,77
Pinscher	10	20,83	1	6,25	3	13,04	2	15,38
Dachshund	7	14,58	0	0	0	0	1	7,69
Yorkshire	5	10,41	0	0	1	4,34	0	0
Cocker Spaniel	2	4,16	1	6,25	0	0	1	7,69
Labrador	1	2,08	0	0	0	0	0	0
Maltês	1	2,08	0	0	0	0	0	0
Pastor Alemão	1	2,08	0	0	0	0	0	0
Fox Paulistinha	0	0,0	1	6,25	1	4,34	0	0

Legenda: CTM I / II: carcinoma em Tumor Misto grau I ou II, (-): sem metástase para linfonodo, (+): com metástase para linfonodo, n: número total de casos no subgrupo, SRD: Sem raça definida.

Dentre os fatores hormonais relacionados ao câncer de mama em cadelas, destacam-se a castração, utilização de progestágenos e pseudociese (OLIVEIRA et al., 2003). Em todos os subgrupos dos CTM I e CTM II, houve uma frequência superior a 75% de cadelas não castradas. E na maioria dos casos em que a cadela era castrada, os tutores não sabiam informar o período de realização deste procedimento. A frequência de cadelas não castradas foi ainda maior nos subgrupos que apresentaram metástase, 81,25% e 84,61%, para CTM I (+) e CTM II (+), respectivamente.

No geral, é observado nos levantamentos clínico-epidemiológicos de

neoplasias mamárias uma frequência muito baixa de cadelas castradas (D'ASSIS, 2017; TORÍBIO et al., 2012; RASOTTO et al., 2017; SANTOS, 2020). Esses resultados enfatizam a necessidade da utilização da castração como ferramenta profilática e terapêutica diante da dependência hormonal dos tumores mamários (ESTRELA-LIMA, 2010; HAHN et al., 1992; MULLIGAN, 1975; PRIESTER, 1979; SILVA et al., 2004; VOORWALD et al., 2013).

Sabe-se que cadelas castradas apresentam incidência de tumores mamários três a sete vezes menor do que os animais não castrados (HAHN et al., 1992; MULLIGAN, 1975; PRIESTER, 1979). O período ideal para execução do procedimento da castração é ainda controverso. Schneider (1969) constatou que, quando a castração é realizada antes do primeiro estro, há redução em 99,95% do risco de desenvolvimento da neoplasia mamária. Entretanto, Cassali e colaboradores, (2014) indicam a realização da ovariectomia após o primeiro estro, para que haja um completo desenvolvimento musculoesquelético, imunológico e endócrino dos animais.

Mais de 50% dos tutores, independente do subgrupo, relataram a não utilização de progestágenos. Contudo, observou-se maior frequência de animais que utilizaram progestágenos nos subgrupos de maior malignidade, 12,25%, 17,39% e 23,07%, para CTM I (+), CTM II (-) e CTM II (+), respectivamente, o que ratifica a ação dos hormônios sexuais na carcinogênese mamária e progressão tumoral. Sabe-se que a utilização de hormônios exógenos, progesterona ou estrógeno, aumentam o risco de desenvolvimento de neoplasias mamárias em cadelas, dentre outros mecanismos pelo aumento do número de receptores de estrógeno (SILVA et al., 2004). Mesmo em baixas doses a progesterona exógena pode induzir neoplasias benignas e a combinação destes dois hormônios, pode induzir o desenvolvimento de tumores malignos (GOLDSCHMIDT et al., 2017).

Resultados similares foram observados em relação a pseudociese, com maior frequência nos subgrupos CTM I (+) e CTM II (+), 31,25 e 76,92%, respectivamente. Nesse caso, a pseudociese pode estar relacionada ao aparecimento precoce de neoplasia mamária na cadela, bem como maior frequência de tumores malignos (OLIVEIRA et al., 2003). Importante salientar, que geralmente os CTM se originam da transformação maligna do componente epitelial dos tumores mistos benignos (MISDORP et al., 2002), portanto, a maior frequência do uso de métodos contraceptivos a base de progesterona, assim como a ocorrência de pseudociese,

nesses subgrupos podem estar relacionados com a progressão de malignidade do tumor.

Em 35,9% (23/64) e 30,55% (11/36) dos casos dos subgrupos CTM I e CTM II, respectivamente, não foi possível avaliar o tempo de detecção do tumor pelo tutor, devido à falta de preenchimento destes dados na ficha clínica, bem como pela ausência do contato do tutor. Nos casos em que essa informação foi obtida, pôde-se observar que a frequência do tempo de detecção da doença foi maior nos subgrupos de maior malignidade do tumor, até um ano para CTM I (+) e até três anos para CTM II (+). Estes resultados ratificam a ideia de progressão tumoral ao longo do tempo e a importância do diagnóstico precoce.

A correlação dos dados socioeconômicos dos tutores aos achados clínico-patológicos das cadelas com neoplasia mamária em Salvador, BA já foi relatada e demonstrou maior frequência de casos com prognóstico desfavorável frente a população mais vulnerável e sem conhecimento da doença (SANTOS, 2020; TORIBIO et al, 2012). A avaliação dos dados socioeconômicos dos tutores não é um objetivo específico do presente estudo. Contudo, o significativo intervalo de tempo observado entre a detecção do tumor pelo tutor e a procura por assistência médica veterinária (tempo de detecção da doença) demonstra que a desinformação sobre a importância/letalidade dos tumores de mama nos animais associado a situação economicamente mais vulnerável da população influencia diretamente no tempo de detecção, conseqüentemente no estadió clínico e prognóstico dos animais (NUNES et al., 2019).

Informações a respeito das características macroscópicas do tumor e estadió clínico da paciente revelaram nos subgrupos sem metástase [CTM I (-) e CTM II (-)] maior frequência de tumores localizados nas mamas abdominais (56,25% e 82,60), não ulcerados, menores que três centímetros, ou seja, estadió I (77,08% e 43,47%). Enquanto, nos subgrupos com metástase [CTM I (+) e CTM II (+)] foram predominantes os tumores localizados nas mamas inguinais (56,25% e 53,84%), ulcerados, maiores que cinco centímetros (50% e 61,53%), estadió IV (93,75% e 84,61%). O maior acometimento de mamas inguinais observado neste estudo corrobora os achados descritos na literatura (NUNES, et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2003; TORÍBIO et al., 2012). Misdorp (2002) justifica a maior frequência nas mamas abdominais e inguinais devido a abundância de parênquima mamário que intensifica a

proliferação celular em resposta a influência hormonal.

Em relação à ulceração, esta característica não foi observada nos tumores do grupo I, possivelmente por este ser também o grupo que apresentou predominância de tumores menores que três centímetros. Nos outros subgrupos, cujos tumores eram maiores que três centímetros, a ulceração esteve presente, ainda que sem predomínio no grupo. Nos carcinomas em tumores mistos a frequência de ulceração não costuma ser alta e deve ser avaliada com cautela, visto que podem estar envolvidas outras causas além do grande crescimento tumoral, como traumas e infecções dérmicas (NUNES et al., 2019).

Nos subgrupos com metástase para linfonodo, foram observados três casos de metástase pulmonar, detectadas no momento do diagnóstico do tumor primário, o que confere, em ambos os casos, o estadió V de pior prognóstico. No caso da cadela do subgrupo CTM I (+), o tempo de detecção do tumor pelo tutor foi de 18 meses; o tumor media 4,5 cm, o animal não realizou quimioterapia e a sobrevida global foi de apenas 51 dias. Nos casos do subgrupo CTM II (+), em um dos animais o tempo de detecção foi de 3 anos, o tumor media 6,7 cm, não foi realizada quimioterapia e sobrevida foi de 39 dias; no segundo animal o tempo de detecção foi de seis meses, o tumor media 9,8 cm, foi realizada quimioterapia e a sobrevida foi de 673 dias.

Diversos autores consideram o tamanho tumoral e o estadió clínico parâmetros prognósticos de alta relevância (CASSALI et al., 2012; 2014; CAVALCANTI, CASSALI, 2006; ESTRELA-LIMA et al., 2010; SORENMO, 2003; MISDORP et al. 1999; PELETEIRO, 1994). O tamanho do tumor está diretamente relacionado a diferenciação tumoral, além de ser uma técnica simples e reproduzível (FERREIRA et al., 2009). O presente estudo indica relação direta entre o tempo de detecção/observação da neoplasia pelo tutor com o tamanho tumoral, estadió avançado e conseqüentemente maior malignidade.

No subgrupo CTM I (-) a maioria dos tutores relatou a observação da neoplasia em um período de até seis meses com maior frequência de tumores T1 (sistema TNM), ou seja, menores que três centímetros. Enquanto nos outros subgrupos o tempo para observação/detecção foi igual ou superior a três anos com maior frequência de neoplasias maiores que três centímetros (T2 e T3), com metástase regional ou maior grau histopatológico. Cadelas portadoras de carcinomas em tumores mistos geralmente apresentam estadió I (NUNES et al., 2019), o que difere, em parte, dos dados

apresentados no presente estudo, pois no CTM II (-) a frequência foi igualmente distribuída entre os estádios II e III, o que evidencia maior tamanho dos tumores (T2 e T3), além do maior grau e prognóstico desfavorável.

Os subgrupos CTM I (+) e CTM II (+), que apresentavam metástase para linfonodo, tiveram maior frequência de animais que evoluíram para o óbito em decorrência do tumor, 50% e 76,92%, respectivamente. Estes resultados demonstram significativo potencial de malignidade e letalidade dos CTMs e diferem dos relatos da literatura, segundo os quais, os carcinomas em tumores mistos, via de regra, apresentam comportamento biológico favorável, com excelente prognóstico (RASOTTO et al., 2017, NUNES et al., 2019). Contudo, o prognóstico preconizado, na literatura, para os CTMs deve ser avaliado com muita cautela, pois a própria variação do grau (II ou III) pode conferir maior potencial de malignidade aos CTM. Além disso, como investigado neste estudo, características histomorfológicas, isoladas ou associadas, aparentemente podem contribuir para o maior potencial de malignidade, até mesmo nos CTM de baixo grau, conferindo a estes tumores um comportamento mais agressivo que pode ser classificado como adverso ou “atípico”.

O tratamento quimioterápico é indicado para todos os pacientes que apresentem tumor com diagnóstico histológico agressivo, como carcinomas sólidos, carcinomas micropilares, carcinomas anaplásicos e carcinossarcomas, mesmo quando as metástases linfonodais ou pulmonares não são evidentes, ou ainda quando há metástase, independentemente do tipo histológico do tumor (CASSALI et al., 2014).

Contudo, apenas 25% (13/52) dos animais com indicação foram submetidos a quimioterapia por opção ou falta de recurso financeiro do tutor. Dessa forma é extremamente importante o papel do médico veterinário na conscientização dos tutores a respeito da gravidade da doença e a necessidade de continuidade do tratamento, fator que reflete diretamente na taxa de sobrevivência das pacientes (MACHADO et al., 2018).

No subgrupo CTM I (-), no qual, na maioria dos casos, o tratamento cirúrgico é curativo, dois animais foram submetidos a quimioterapia. No primeiro caso, a paciente possuía um tumor maior que cinco centímetros e a indicação para realização da quimioterapia convencional a base de carboplatina foi fundamentada apenas na observação do significativo pleomorfismo das células neoplásicas, pois o arranjo tubular e baixo índice mitótico mantinha o tumor alocado no grau I; e no segundo

caso, a cadela apresentou metástase pulmonar, posterior ao diagnóstico do tumor, não detectada pelo exame radiográfico pré cirúrgico. Esta paciente foi submetida a quimioterapia convencional a base de carboplatina seguida pela quimioterapia metronômica a base de ciclofosfamida e apresentou uma sobrevida de 760 dias. Os dados referentes as características clínicas e epidemiológicas podem ser encontrados na Tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros clínicos avaliados nos 100 casos de carcinomas em tumores mistos de cadelas dos grupos I e II, com e sem metástase para linfonodo, diagnosticadas pelo NPqOM – HOSPMEV/UFBA

Características clínicas		CTM GRAU I				CTM GRAU II			
		(-)		(+)		(-)		(+)	
		n=48	n=16	n=23	n=13	Total de casos	%	Total de casos	%
Status reprodutivo	Inteira	36	75	13	81,25	18	78,26	11	84,61
	Castrada	8	16,66	1	6,25	3	13,04	1	7,69
	NI	4	8,33	2	12,25	2	8,69	1	7,69
Uso de anticoncepcional	Sim	2	4,16	2	12,25	4	17,39	3	23,07
	Não	35	72,91	9	56,25	16	69,56	9	69,23
	NI	11	22,91	5	31,25	3	13,04	1	7,69
Pseudocirose	Sim	20	41,66	1	6,25	9	39,13	1	7,69
	Não	14	29,16	5	31,25	8	34,78	10	76,92
	NI	14	29,16	10	62,50	6	26,08	2	15,38
Cadeia mamária acometida	Direita	23	47,91	6	37,50	6	26,08	5	38,46
	Esquerda	14	29,16	6	37,50	5	21,73	2	15,38
	Ambas	5	10,41	4	25	10	43,47	5	38,46
	NI	6	12,50	0	0	2	8,68	1	7,69
Localização	M1 e M2	1	2,08	2	12,25	0	0	2	15,38
	M3 e M4	27	56,25	5	31,25	19	82,60	4	30,76
	M5	20	41,66	9	56,25	4	17,39	7	53,84
Ulceração	Sim	0	0	5	31,25	2	8,69	2	15,38
	Não	48	100	11	68,75	21	91,30	11	84,61
Tempo de detecção	<1 mês	8	16,66	0	0	1	4,34	0	0
	1 a 6 meses	11	22,91	1	6,25	4	17,39	2	15,38
	6 a 12 meses	3	6,25	7	43,75	3	13,04	1	7,69
	1 a 3 anos	8	16,66	2	12,25	5	21,73	5	38,46
	>3 anos	0	0	1	6,25	3	13,04	1	7,69
	NI	18	37,50	5	31,25	7	30,43	4	30,76
Tamanho	≤ 3,0 cm	37	77,08	5	31,25	10	43,47	3	23,07
	3,1 a 5,0 cm	10	20,83	3	18,75	6	26,08	2	15,38
	>5,0 cm	1	2,08	8	50	7	30,43	8	61,53
Estadiamento	I	37	77,08	0	0	10	43,47	0	0
	II	10	20,83	0	0	6	26,08	0	0
	III	1	2,08	0	0	7	30,43	0	0

	IV	0	0	15	93,75	0	0	11	84,61
	V	0	0	1	6,25	0	0	2	15,38
Metástase a distância	Sim	0	0	1	6,25	0	0	2	15,38
	Não	48	100	15	93,75	23	100	11	84,61
Quimioterapia	Sim	2	4,16	0	0	10	43,47	1	7,69
	Não	46	95,83	9	56,25	6	26,08	7	53,84
	NI	0	0	7	43,75	7	30,43	5	38,46

Legenda: CTM: carcinoma em Tumor Misto, (-): sem metástase para linfonodo, (+): com metástase para linfonodo, NI: Não Informado, M1: Mama Torácica Cranial, M2: Mama Torácica Caudal, M3: Mama Abdominal Cranial, M4: Mama Abdominal Caudal, M5: Mama Inguinal.

6.2 PARÂMETROS HISTOMORFOLÓGICOS DOS CTMS GRAU I E II

Matriz associada

A matriz mixóide isolada foi frequente em quase todos os subgrupos avaliados, dos quais CTM I (-), CTM II (-) e CTM II (+) tiveram frequência superiores ao subgrupo CTM I (+) (Figuras 2A-B-D). Esse resultado é semelhante ao descrito na literatura, do qual geralmente se observa CTM com um único tipo de matriz, na maioria das vezes, mixóide (RIBEIRO et al., 2012). Por sua vez, o subgrupo CTM I (+) revelou frequência significativamente maior ($p=0,004$) de matriz mixoide associada a algum tipo de tecido maduro (Figuras 2E-F) (43,75%), destacando-se a formação de cartilagem e trabéculas ósseas (Figura 2C).

A presença dos componentes mioepiteliais e mesenquimais benignos em CTM, a princípio, pode sugerir um comportamento biológico favorável, diferentemente do observado no presente estudo, no qual o maior percentual de tecido maduro no subgrupo CTM I (+) está associado ao seu comportamento “atípico” ou seja, de maior malignidade apesar do baixo grau.

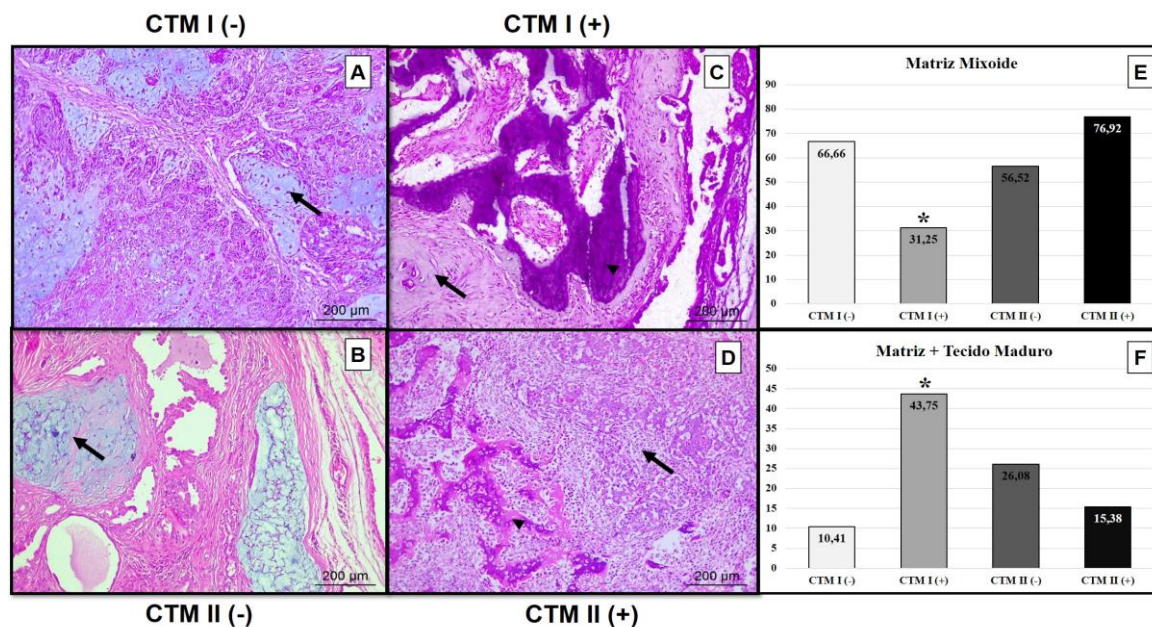
Acredita-se que os componentes mesenquimais, presentes nos tumores mistos, sejam produzidos pelas células mioepiteliais (PANDEY, 2011) ou ainda resultem da dediferenciação do mioepitélio, processo denominado transição mioepitélio-mesenquima (CASSALI et al., 2012). Pesquisadores já demonstraram alguns componentes envolvidos neste processo de transição, dentre eles, o versican (ERDELYI et al., 2003; 2005; DAMASCENO et al., 2012; 2014). Este proteoglicano de matriz extracelular aparentemente atua na condrogênese precoce, e sua expressão

apresenta-se aumentada nas células mioepiteliais a medida em que elas adquirem características mesenquimais, o que sugere uma mudança de fenótipo para diferenciação celular condróide (DAMASCENO et al., 2014).

A mudança fenotípica das células mioepiteliais é capaz de promover mudanças no estroma, estimular ainda mais a proliferação celular, angiogênese e transição epitelial-mesenquimal (TEM), por meio da ativação de complexas vias de sinalização (DUFFY et al., 2000; MAN, 2007). Com isso, ocorre descontrole do crescimento e da diferenciação celular, produção de componentes da matriz extracelular, melhor capacidade migratória e de invasividade, maior resistência a apoptose e alto potencial metastático (CHOI et al., 2013; THIERY, 2002).

Na mulher, os carcinomas metaplásicos com produção de matriz apresentam similaridades morfológicas com os carcinomas em tumores mistos de mama em cadelas, além do amplo espectro de padrões histológicos e alta heterogeneidade (CASSALI et al., 2012; MCMULLEN et al., 2019; SAAD et al., 2017; 2018; WARGOTZ; NORRIS, 1989). Possivelmente, a metaplasia observada nos carcinomas metaplásicos da mulher resultem da conversão do componente carcinomatoso em sarcomatoso induzidos pelo processo de TEM (PINHO, 2017). Contudo, no caso dos CTMs da mama de cadelas, associado a transformação epitelial maligna, a transição mio-epitélio mesenquima sustenta a teoria mais aceita sobre a origem destes tumores (CASSALI et al., 2012). Desta forma, com base nos resultados aqui observados propõe-se que a “atipia” observada nos casos de CTM I (+), resulte em parte, de características específicas da matriz extracelular associadas a mudanças genéticas ou epigenéticas sofridas pelo próprio epitélio maligno, bem como diferenças no perfil molecular.

Figura 2. Caracterização histopatológica do carcinoma em tumor misto mamário. Parênquima mamário. A-D. Fotomicrografia. A-B. Matriz mixoide no CTM I (-) e CTM II (-) (seta preta). C. Matriz mixoide no CTM I (+) (seta preta) e trabécula óssea (cabeça de seta). D. Matriz osteoide no CTM II (+) (cabeça de seta). Coloração HE, Objetiva 10x. E-F. Ilustração gráfica. Matriz mixoide e da matriz associada à tecido maduro nos subgrupos CTM I (-), CTM I (+), CTM II (-) e CTM II (+).



Legenda: CTM: Carcinoma em tumor misto; (-): sem metástase; (+): com metástase; (*) p=0,004.

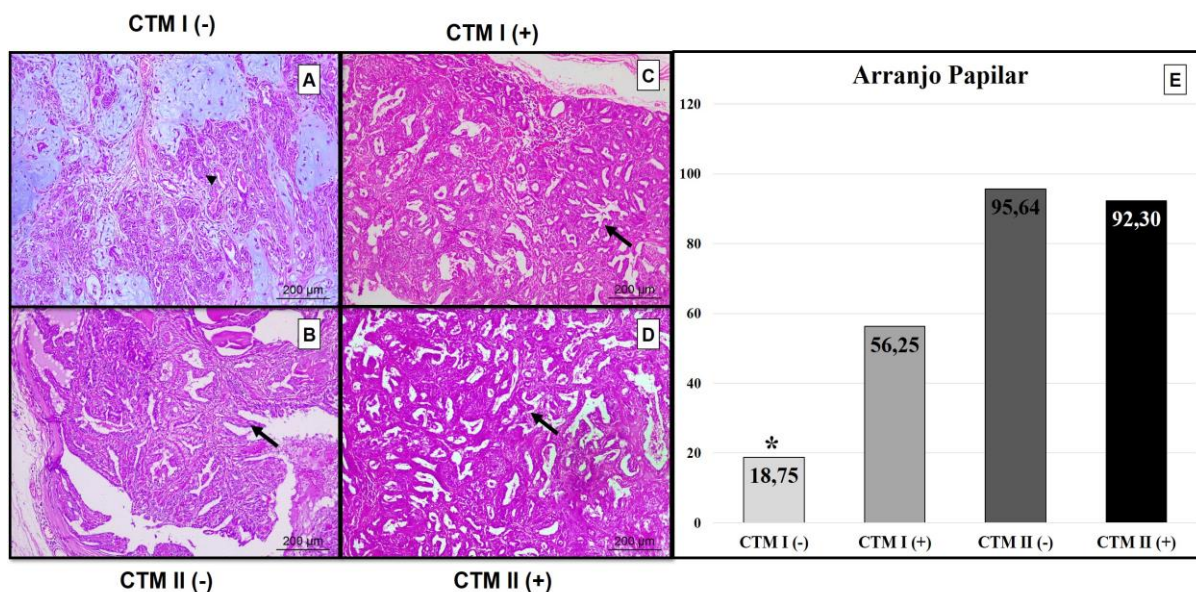
Arranjo epitelial

O arranjo papilar foi predominante em 95,64%, 56,25% e 92,30% nos subgrupos CTM II (-), CTM I (+) e CTM II (+), respectivamente (Figuras 3B, 3C-D e 3E). Resultados que demonstram que durante a evolução tumoral, dentro de um mesmo tipo histológico, há variados graus da perda de diferenciação das células neoplásicas, o que se reflete no arranjo e consequentemente no prognóstico do paciente (PEÑA et al., 2013).

Além disso, o arranjo epitelial papilar, foi significativamente menos frequente no subgrupo CTM I (-) (18,75%) (p=0,008). Neste subgrupo foi observada maior frequência do arranjo tubular (81,25%) (Figura 3A), ratificando a categorização do sistema de escores proposto inicialmente por Elston e Ellis, (1991) para o câncer de mama na mulher e também utilizado para neoplasias mamárias em cães (CASSALI et

al., 2014), do qual o escore 1 está associado ao arranjo tubular, melhor diferenciação celular consequentemente melhor prognóstico.

Figura 3. Caracterização histopatológica do carcinoma em tumor misto mamário. Parênquima mamário. A-D. Fotomicrografia. A. Proliferação de células neoplásicas em arranjo predominantemente tubular no CTM I (-) (cabeça de seta). **B-D.** Proliferação de células neoplásicas em arranjo papilar no CTM II (-), CTM I (+) e CTM II (+) (seta preta). Coloração HE, Objetiva 10x. **E. Ilustração gráfica.** Arranjo papilar nos subgrupos CTM I (-), CTM I (+), CTM II (-) e CTM II (+).



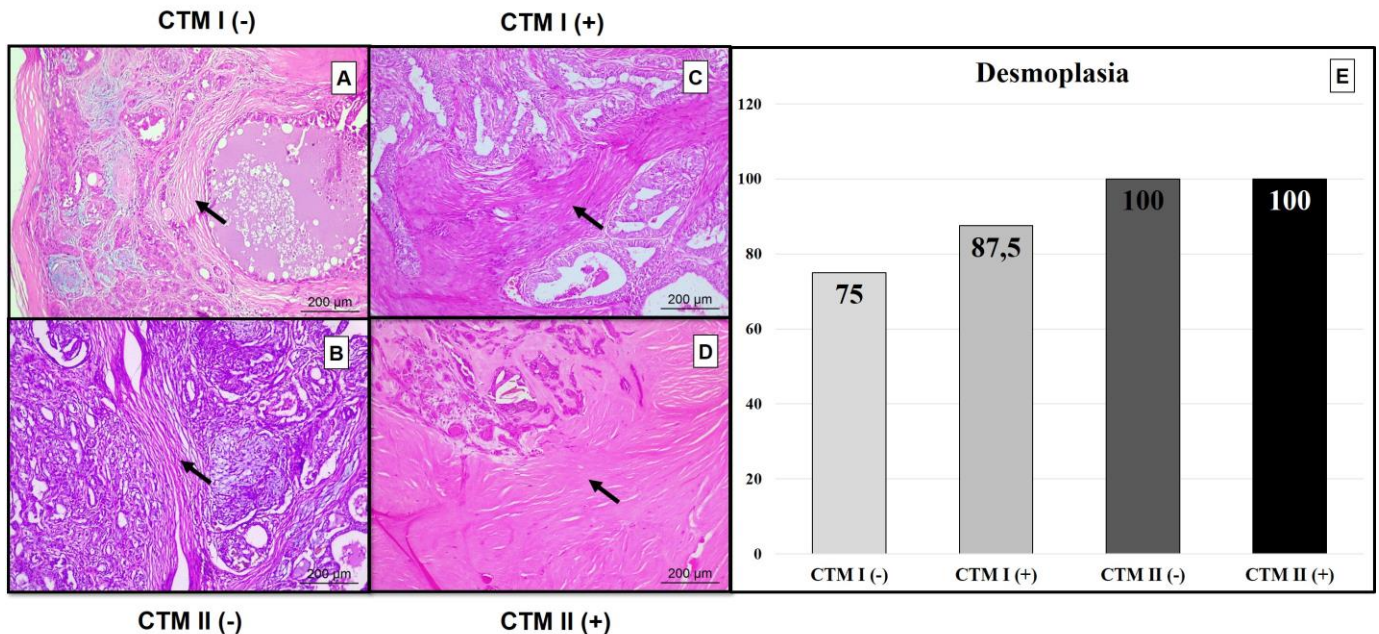
Legenda: CTM: Carcinoma em tumor misto; (-): sem metástase; (+): com metástase; (*) p=0,008.

Desmoplasia

O estroma fibroso bem caracterizado ou desmoplasia, foi observado de forma discreta e multifocal nos subgrupos CTM I (-) (75%) e CTM II (-) (100%) (Figuras 4A-B), moderada a intensa e multifocal nos subgrupos CTM I (+) (87,50%) e CTM II (+) (100%), (Figura 4C-D). Apesar da ausência de significância estatística desse fator entre os grupos estudados, foi possível observar um aumento gradual do percentual de desmoplasia de acordo com a malignidade dos subgrupos (Figura 4E). Carcinomas mamários ductais invasivos da mulher (GUJAM et al., 2014) e carcinomas mamários triplo negativos (KRUIJF et al.; 2011) com alta porcentagem do estroma tumoral foram associados a recidiva e menor sobrevida. No presente estudo, o alto percentual (87,50%) de desmoplasia observado no subgrupo CTM I (+) pode também contribuir para justificar seu comportamento “atípico”. Vale ressaltar, a facilidade de execução

desse método na rotina histopatológica, o que seria de grande auxílio aos oncologistas veterinários para estratificar o risco nesses pacientes.

Figura 4. Caracterização histopatológica do carcinoma em tumor misto mamário. Parênquima mamário. A-D. Fotomicrografia. A-B. Desmoplasia discreta no CTM I (-) e CTM II (-) (seta preta). C-D. Desmoplasia moderada a intensa no CTM I (+) e CTM II (+) (seta preta). Coloração HE, Objetiva 10x. E. Ilustração gráfica. Desmoplasia nos subgrupos CTM I (-), CTM I (+), CTM II (-) e CTM II (+).



Legenda: CTM: Carcinoma em tumor misto; (-): sem metástase; (+): com metástase; (*) p=0,008

Infiltrado Inflamatório associado ao tumor

Nos subgrupos CTM I (-) e CTM II (-), o infiltrado inflamatório peritumoral, quando presente, era predominantemente linfocítico, leve a moderado e multifocal, 37,50% e 26,08%, respectivamente (Figura 5A-B). O mesmo tipo inflamatório se repetia quando intratumoral, 39,58% e 21,73%, com diferença estatística significativa entre os subgrupos (p=0,03).

Nos subgrupos CTM I (+) e CTM II (+), o infiltrado inflamatório peritumoral, quando presente, era linfohistioplasmocitário, moderado a intenso e multifocal, 50% e 30,76%, respectivamente (Figuras 5C-D). O mesmo tipo inflamatório se repetia quando intratumoral, 56,25% e 30,76%, respectivamente. Além disso, o subgrupo CTM I (+) apresentou maior frequência de infiltrado linfohistioplasmocitário, tanto

peri, quanto intratumoral, ambos com diferença estatística significativa em relação aos demais subgrupos ($p=0,03$) (Figuras 5E-F).

A avaliação do infiltrado inflamatório associado às neoplasias mamárias também tem sido alvo de interesse tanto na oncologia humana quanto na veterinária, do qual acredita-se que a depender dos tipos e subtipos celulares envolvidos e da intensidade da inflamação, há diferentes interferências na progressão ou regressão tumoral, assim como na resposta ao tratamento e nas taxas de sobrevivência (BLANKENSTEIN, 2004; ESTRELA-LIMA et al., 2010; 2012; 2016; VIEIRA-FILHO et al., 2018).

Os carcinomas mamários em mulheres apresentam maior infiltrado linfocítico, representados pelas células T, e acreditava-se que sua presença estivesse relacionada a um melhor prognóstico, visto que os linfócitos participam da inibição da angiogênese e contenção do crescimento tumoral (CAMP et al., 2006). No entanto, a grande maioria dos estudos com câncer de mama da mulher demonstram que a inflamação desempenha um papel que estimula a progressão tumoral (LIN; KAREN, 2007; RONCATI et al., 2016; STEWART; HEPPNER, 1997; THUN et al., 2004).

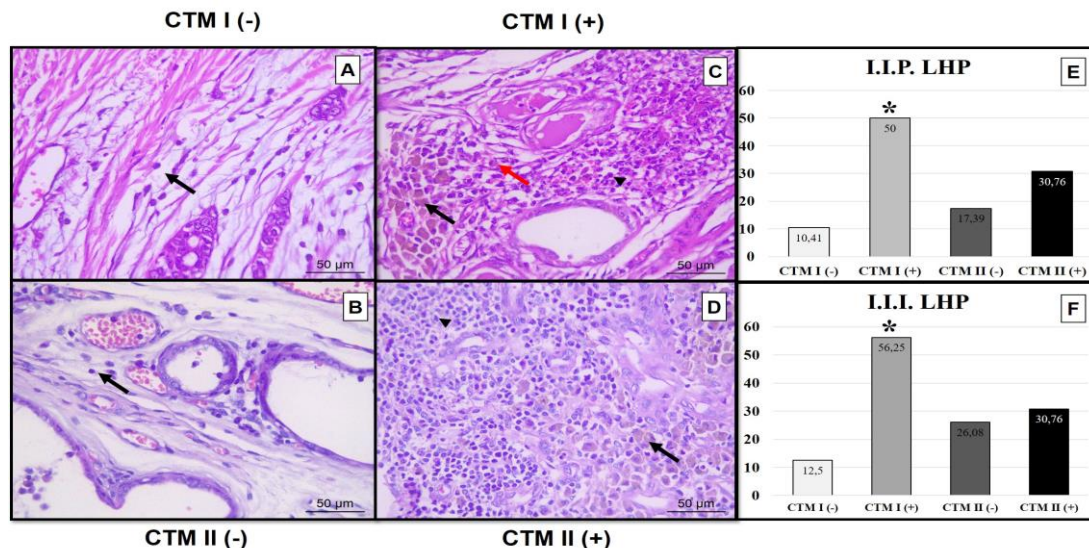
Kim e colaboradores (2010) observaram que os tumores mamários malignos em cadelas são caracterizados por marcante infiltração de mononucleares, particularmente linfócitos presentes no estroma, ao redor de vasos e células neoplásicas. Ao contrário, os linfócitos são raramente observados na glândula mamária normal e em tumores benignos da mama. Estudos mais recentes já demonstraram que os linfócitos infiltrantes do tumor atuam como biomarcadores prognósticos em tumores de mama de mulheres (MAO et al., 2016; STANTON; DISIS, 2016), e que a inflamação pode interagir com as células tronco do câncer de mama, o que influencia na tumorigênese, e estimula a progressão do tumor, no entanto, mais estudos são necessários para esclarecer essa interação (JEONG et al., 2018).

O estudo realizado por Estrela-Lima e colaboradores (2010), que analisou o infiltrado inflamatório associado ao tumor em cadelas, além de definir o linfócito como principal tipo celular, seguido dos macrófagos, também revelou ser os linfócitos T CD4⁺ predominavam nos carcinomas e carcinoma em tumor misto com metástase, e as células T CD8⁺ estavam relacionadas aos carcinomas em tumores mistos sem metástases, ou seja, T CD4⁺ apresentou relação com evolução neoplásica enquanto T CD8⁺ relação com o combate tumoral.

Desta forma, a maior frequência do infiltrado intratumoral linfohistioplasmocitário nos subgrupos com metástase, pode sugerir, dentre outras vias, a ativação predominante de linfócitos T CD4⁺ com resposta do tipo Th2 ou de macrófagos ativados pela via alternativa, pois ambas as situações estimulam a progressão tumoral, metástase, baixa taxa de sobrevida e, conseqüentemente, prognóstico desfavorável (DENARDO e COUSSENS, 2007; ESTRELA-LIMA et al., 2010; KIM et al., 2013; VIEIRA-FILHO et al., 2018).

Estudos direcionados a fenotipagem das células inflamatórias, avaliação de citocinas e microambiente tumoral são necessários para a compreensão total do verdadeiro papel da inflamação associado aos carcinomas mamários na cadela, com ênfase para o carcinoma em tumor misto. No entanto, os achados observados neste estudo, relacionados a inflamação também somam na justificativa do comportamento biológico “atípico” e mais agressivo dos subgrupos com metástase, em especial dos CTM I (+).

Figura 5. Caracterização histopatológica do carcinoma em tumor misto mamário. Parênquima mamário. A-D. Fotomicrografia. A-B. Infiltrado inflamatório linfocítico discreto no CTM I (-) e CTM II (-) (seta preta). **C-D.** infiltrado inflamatório linfohistioplasmocitário moderado a intenso no CTM I (+) e CTM II (+) (linfócito – cabeça de seta; macrófago - seta preta; plasmócito – seta vermelha). Coloração HE, Objetiva 40x. **E. Ilustração gráfica.** Infiltrado Inflamatório peri e intratumoral nos subgrupos CTM I (-), CTM I (+), CTM II (-) e CTM II (+).



Legenda: CTM: Carcinoma em tumor misto; (-): sem metástase; (+): com metástase; (*) p=0,03.

Mitoses

Em todos os subgrupos a maioria dos casos apresentou uma média inferior ou igual a uma mitose por campo de maior aumento. No entanto, destaca-se que no subgrupo CTM I (+) foi observado casos com média superior a uma mitose por campo (18,75%), e com frequência similar a observada nos subgrupos CTM II (-) (39,14%) e CTM II (+) (30,77%) ($p=0,00$).

No atual sistema de graduação empregado em cadelas (CASSALI et al., 2014) são avaliados o arranjo epitelial, o pleomorfismo celular e obtida a média da contagem mitótica em 10 campos de maior aumento. Entretanto, é utilizada uma faixa muito extensa de contagem média de mitose, para alocar os tumores no escore 1 (0 a 8 mitoses) (CASSALI et al., 2014). Desta forma, este método de graduação quando aplicada para carcinomas em tumores mistos, que em sua maioria, não apresentam médias superiores a uma mitose por campo de maior aumento, pode resultar em malignidade subestimada.

Em mulheres, a alta contagem de mitoses já demonstrou ser preditiva em relação risco de morte em neoplasias mamárias, de forma superior ao tamanho do tumor, invasão linfática ou de pele (CLAYTON, 1991). No entanto, a avaliação da contagem mitótica pode sofrer diferentes variações de acordo com a heterogeneidade da celularidade do tumor, variação da área do campo de alta potência do microscópio e tempo/condição de acondicionamento da amostra, justificando a importância da contagem média realizada (VAN-DIEST et al., 1992).

Formação capsular

A formação capsular também foi frequentemente observada em todos os grupos, porém com menor percentual (43,75%) no subgrupo do CTM I (+) e sem diferença estatística entre os subgrupos. Geralmente, a cápsula representa uma defesa do hospedeiro e atua como barreira física e quando associada aos tumores tendem a restringir seu crescimento, e portanto, estão frequentemente relacionadas a tumores benignos ou de melhor prognóstico (LUBKIN; JACKSON, 2002). No entanto, devido as alterações existente no microambiente tumoral, os fibroblastos do estroma alteram seu comportamento e atuam de forma a favorecer o tumor ao longo do tempo, pelo estímulo à invasão, angiogênese e metástase (RAHMANZADE, 2020), o que pode justificar o fato dos tumores do subgrupo CTM I (+) apresentarem-se com maior frequência não encapsulados e comportamento mais agressivo.

Necrose e número de vasos

Áreas de necrose, com distribuição que variavam de focal a multifocal, foram observados com frequência de 41,66% no CTM I (-), 50% no CTM I (+), 52,17% no CTM II (-) e 53,84% no CTM II (+) e de forma crescente de acordo com a malignidade do subgrupo, porém sem diferença estatística ($p=0,77$). Em relação a quantidade de vasos todos os subgrupos demonstraram uma frequência acima de 68% e acima de 50%, para até 25 vasos, peritumorais e intratumorais, respectivamente ($p=0,05$).

De forma interessante, o subgrupo CTM I (+) apresentou menor percentual de quantidade de vasos peri e intratumorais, 68,75% e 50%, respectivamente, além de apresentarem tumores grandes, maiores que cinco centímetros. Estes resultados apresentam relação inversa entre o maior tamanho tumoral observado neste grupo, o que sugere rápido crescimento tumoral, e a angiogênese ineficiente.

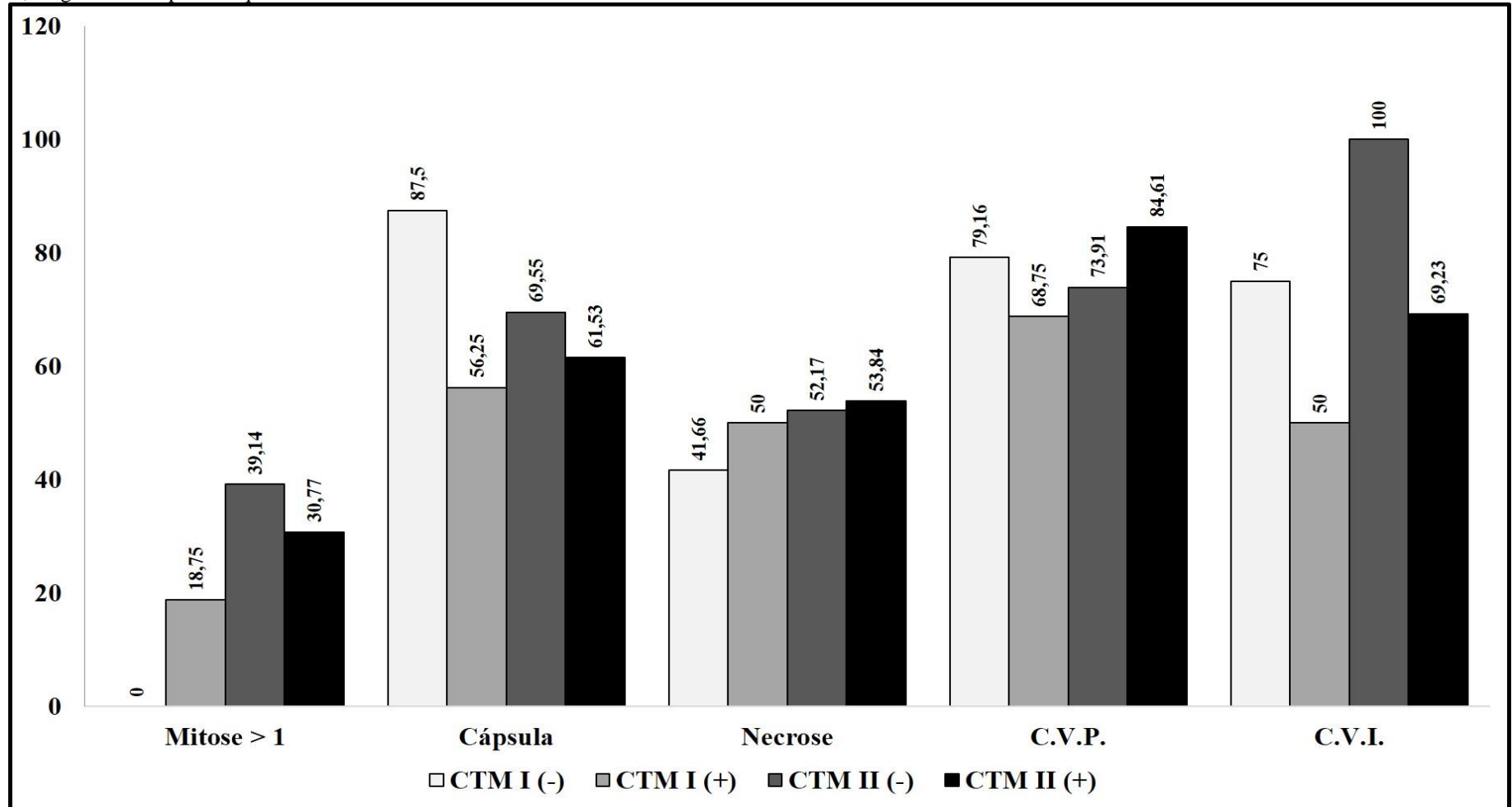
Em carcinomas endometriais agressivos a necrose tumoral foi associada uma complexa via de alterações no microambiente tumoral que levam a hipóxia, angiogênese e inflamação (BREDHOLT et al., 2015). Em carcinomas mamários de mulheres com metástase linfonodal, a hipóxia está associada a progressão e agressividade tumoral, além de atuar como um parâmetro prognóstico para tumores de menores tamanhos (T1 e T2) (GRUBER et al., 2004).

Em neoplasias mamárias de mulheres também foi observada relação inversa entre a contagem de vasos periféricos e o tamanho tumoral; ausência de diferença significativa entre a quantidade desses vasos em neoplasias com e sem metástase para linfonodos regionais. Os mesmos autores ainda sugerem que a angiogênese é um fenômeno temporal, que geralmente corre no início da carcinogênese e é independente da via linfática de metástase (WAPNIR et al., 2001).

Ressalta-se que em dois casos, um do subgrupo CTM I (+) e outro do subgrupo CTM II (+), foi observado invasão vascular peritumoral. Em ambos os casos, apesar de indicado a instituição do tratamento quimioterápico, o mesmo não foi autorizado pelo tutor e no animal do subgrupo CTM II (+) e houve evolução para carcinoma inflamatório secundário pós cirúrgico.

Os dados referentes as demais características histomorfológicas estudadas podem ser observados na Tabela 5 e Figura 6.

Figura 6. Características histomorfológicas em carcinomas em tumores mistos de mama de cadelas dos subgrupos CTM I (-), CTM I (+), CTM II (-) e CTM II, diagnosticadas pelo NPqOM – HOSPMEV/UFBA.



Legenda: C.V.P.: Contagem de vasos peritumorais; C.V.I.: Contagem de vasos intratumorais.

Tabela 5. Parâmetros histomorfológicos avaliados nos 100 casos de carcinomas em tumores mistos de cadelas dos grupos I e II, com e sem metástase para linfonodo, diagnosticadas pelo NPqOM – HOSPMEV/UFBA.

Características histopatológicas	CTM GRAU I				CTM GRAU II				p		
	(-) n=48		(+) n=16		(-) n=23		(+) n=13				
	n	%	n	%	n	%	n	%			
Tipos de Matriz	Mixoide	32	66,66	5	31,25	13	56,52	1 0	76,92	0,004	
	Condroide	1	2,08	0	0	0	0	0	0		
	Osteoide	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Mista	9	18,75	4	25,00	3	13,04	0	0		
	Matriz + Tec. Mad.	5	10,41	7	43,75*	6	26,08	2	15,38		
Tec. Mad.	1	2,08	0	0	1	4,34	1	7,69			
Arranjo células epiteliais	Tubular	39	81,25	7	43,75	1	4,34	1	7,69	0,008	
	Papilar	9	18,75*	9	56,25	22	95,64	1 2	92,30		
Desmoplasia	Sim	36	75,00	1 4	87,50	23	100	1 3	100	0,013	
	Não	12	25	2	12,50	0	0	0	0		
	Leve	16	33,33	4	28,57	17	73,91	6	44,44		0,05
	Moderado	12	25	8	57,14	4	17,39	6	44,44		
Intenso	8	16,66	2	14,28	2	8,69	1	11,11			
I.I.P.	Ausente	16	33,33	4	25,00	5	21,73	6	46,15	0,03	
	Linfocítico	18	37,50	3	18,75	6	26,08	1	7,69		
	Macrofágico	3	6,25	1	6,25	4	17,39	2	15,38		
	LH ou LP	6	12,50	0	0	4	17,39	0	0		
	LHP	5	10,41	8	50*	4	17,39	4	30,76		
I.I.I.	Ausente	13	27,08	0	0	4	17,39	4	30,76	0,03	
	Linfocítico	19	39,58	3	18,75	5	21,73	1	7,69		
	Macrofágico	4	8,33	2	12,25	4	17,39	3	23,07		
	LH ou LP	6	12,50	2	12,25	4	17,39	1	7,69		
	LHP	6	12,50	9	56,25*	6	26,08	4	30,76		
Média Mitose / 10 cp	≤1	48	100	1 4	81,25	19	60,86	9	69,23	0,00	
	>1	0	0	2	18,75	4	39,14	4	30,77		
Cápsula	Sim	42	87,50	9	56,25	19	69,55	1 1	61,53	0,05	
	Não	6	12,50	7	43,75	4	8,69	2	7,69		
Necrose	Sim	20	41,66	8	50	12	52,17	7	53,84	0,77	
	Não	28	58,33	8	50	11	47,82	6	46,15		
C.V.P.	Ausente	0	0	3	18,75	2	8,69	0	0	0,05	
	1 a 25	38	79,16	1 1	68,75	17	73,91	1 1	84,61		
	26 a 50	8	16,66	2	12,50	4	17,39	0	0,00		
	>50	2	4,16	0	0	0	0	2	15,38		
C.V.I.	Ausente	7	14,58	7	43,75	0	0	4	30,76	0,05	
	1 a 25	36	75	8	50	23	100	9	69,23		
	26 a 50	5	10,41	1	6,25	0	0	0	0		
	>50	0	0	0	0	0	0	0	0		

Legenda: CTM: carcinoma em Tumor Misto, (-): sem metástase para linfonodo, (+): com metástase para linfonodo, n: número de casos do grupo ou subgrupo, Tec. Mad.: Tecido maduro, C.V.P.: Contagem de vasos

peritumorais, CV.I.: Contagem de vasos intratumorais;, I.I.I.: Infiltrado inflamatório intratumoral, I.I.P.: Infiltrado inflamatório intratumoral, LH: Linfohistiocitário, LP: Linfoplasmocitário, LHP: linfohistioplasmocitário, 10 cp: em dez campos; (*): Valor de p estatisticamente significativo por categorização binária q

Dos 36 animais dos subgrupos que apresentavam metástase para linfonodo [16 CTM I (+) e 13 CTM II (+)], o arranjo celular metastático predominante nos parênquimas nodais foi sólido (43,75%) seguido por células isoladas (53,84%) nos casos dos subgrupos CTM I (+) e CTM II (+), respectivamente (Figura 7). De forma interessante, o arranjo metastático só foi idêntico ao observado no tumor primário em dois casos para cada subgrupo CTM I (+) e CTM II (+) (Tabela 6), o que demonstra a pobre diferenciação das células tumorais metastáticas.

Araújo e colaboradores (2015) demonstraram que a caracterização morfológica de linfonodos (número de linfonodos acometidos, o número de focos metastáticos, o diâmetro e a área da metástase) em cadelas acometidas por neoplasias mamárias têm demonstrado relevância prognóstica. Neste mesmo estudo foram ainda avaliados 11 casos de linfonodos positivos provenientes de animais acometidos por carcinomas em tumores mistos, sem distinção do grau, e predominância do arranjo de células isoladas nos linfonodos.

Figura 7. Caracterização histopatológica do carcinoma em tumor misto mamário. Metástase em linfonodos. Proliferação de células neoplásicas invadindo o parênquima nodal com variadas apresentações no arranjo. **A** – Sólido (seta preta). **B** - Tubular (seta preta). **C** - Células isoladas (seta preta). **D** - Papilar (seta preta). Coloração HE. Objetivas 40x.

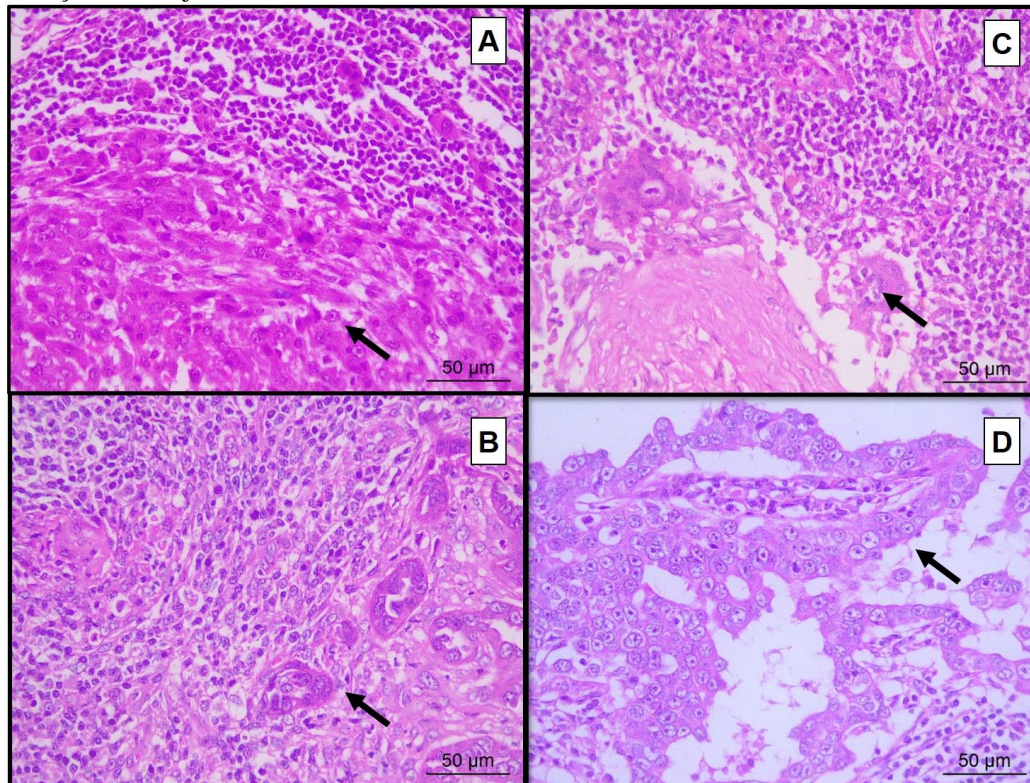


Tabela 6. Características celular das metástases nodais dos carcinomas em tumores mistos de cadelas dos grupos I e II, com metástase para linfonodo, diagnosticadas pelo NPqOM – HOSPMEV/UFBA.

Características celular das metástases nodais		CTM GRAU I		CTM GRAU II	
		(+) n=16		(+) n=13	
		Total de casos	%	Total de casos	%
Arranjo	Tubular	2	12,50	0	0
	Papilar	2	12,50	2	15,38
	Sólido	7	43,75	4	30,76
	Células Isoladas	5	31,25	7	53,84
Semelhante ao tumor primário	Sim	2	12,5	2	15,38
	Não	14	87,5	11	84,61

Legenda: CTM: carcinoma em Tumor Misto, (-): sem metástase para linfonodo, (+): com metástase para linfonodo.

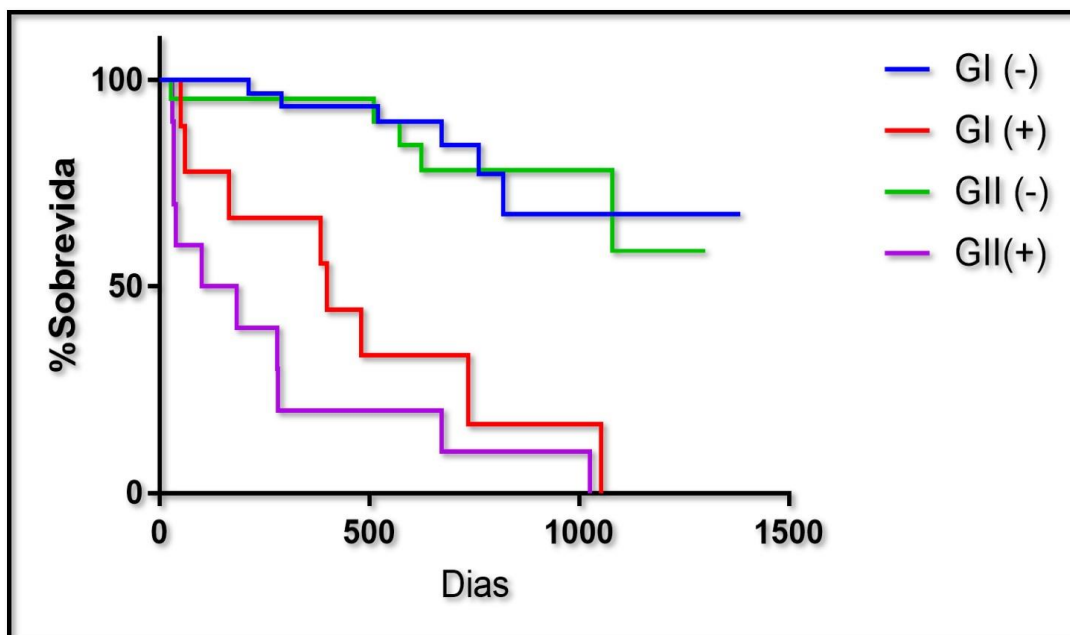
Sobrevida

Na avaliação das curvas de sobrevida, foi possível obter dados de 74 animais [33 CTM I (-), 9 CTM I (+), 22 CTM II (-) e 10 CTM II (+)] e observou-se que os animais dos subgrupos CTM I (-) e CTM II (-) apresentaram maiores taxas de sobrevida quando comparados aos subgrupos CTM I (+) e CTM II (+).

Similaridades no traçado podem ser observadas entre as curvas de sobrevida dos subgrupos CTM I (+) e CTM II (+), o que ratifica o comportamento mais agressivo do grupo CTM I (+), pois de forma “atípica” apesar do baixo grau histopatológico apresenta características semelhantes ao grupo de pior prognóstico aqui estudado (Figura 8).

Nos subgrupos CTM I (-), CTM I (+), CTM II (-) e CTM II (+) a mediana da sobrevida foi 655, 399, 676,5 e 142 dias, respectivamente. O tempo mínimo de sobrevida foi de 31 dias atribuído ao animal do subgrupo CTM II (+) com evolução para carcinoma inflamatório mamário secundário após mastectomia, e o maior tempo de sobrevida foi 1.384 dias para o animal do subgrupo CTM I (-) que permanece vivo até a finalização deste estudo.

Figura 8 – Curva de sobrevida das cadelas acometidas por carcinomas em tumores mistos dos grupos I e II, com e sem metástase para linfonodo, diagnosticadas pelo NPqOM – HOSPMEV/UFBA.



A análise da influência dos parâmetros, com relação à sobrevida, de forma univariada, observou-se que o tempo de detecção do tumor (≥ 6 meses) ($p=0,004$), arranjo epitelial papilar ($p=0,009$), formação capsular ($p=0,014$), contagem de vasos intratumorais ($p=0,000$), maior intensidade da inflamação peritumoral ($p=0,000$), tipo inflamatório peritumoral (linfocitoplasmocitário) ($p=0,001$) e tipo inflamatório intratumoral (linfocitoplasmocitário) ($p=0,005$) tiveram influência.

Na análise multivariada, essas variáveis, com exceção do arranjo epitelial papilar mantiveram a sua influência na sobrevida de cadelas acometidas por carcinomas em tumores mistos mamários, acrescido da influência do tipo de matriz (matriz associada a tecido maduro) (Tabela 2).

Tabela 7 – Análise univariada e multivariada dos parâmetros morfo-histopatológicos associados a sobrevida de cadelas acometidas por carcinomas em tumores mistos diagnosticadas pelo NPqOM – HOSPMEV/UFBA.

Parâmetros	Univariada ^a	Multivariada ^b
Tamanho do tumor	0,531	0,540
Ulceração	0,539	ND
Tempo de detecção do tumor	0,004*	0,000*
Tipo de matriz	0,339	0,034*
Arranjo epitelial	0,009*	0,088
Formação capsular	0,014*	0,025*
Contagem de vasos intratumorais	0,000*	0,000*
Contagem de vasos peritumorais	0,454	ND
Intensidade de desmoplasia estromal	0,0106	0,230
Intensidade da inflamação peritumoral	0,000*	0,000*
Tipo inflamatório peritumoral	0,001*	0,009*
Intensidade da inflamação intratumoral	0,079	0,001*
Tipo inflamatório intratumoral	0,005*	0,009*
Necrose	0,550	0,207

Legenda: a: Correlação de Spearman; b: Regressão logística binária; *: Diferenças significativas a 0,05%; ND: Não determinado.

Desta forma, no presente estudo, o subgrupo CTM I (+) apresentava destaque pela sua alta representatividade (25% dos casos), e foram considerados “atípicos” devido ao seu comportamento metastático e agressivo.

Esse subgrupo apresenta, além da maior agressividade celular e metástase nodal, uma menor sobrevida e necessidade da quimioterapia, semelhante a uma neoplasia de mesmo tipo histológico, porém de maior grau. Esse comportamento está associado a características histomorfológicas como matriz mixoide associada a tecido maduro, arranjo papilar, inflamação linfocitoplasmocitária, maior desmoplasia e menor quantidade de vasos peri e intratumorais.

Esse estudo contribui para a identificação de características histomorfológicas preditivas de metástases em cadelas que apresentem CTM de baixo grau, porém de alta agressividade, ratifica a proposta de revisão desses padrões morfológicos para esse tipo histológico especificamente, e auxilia oncologistas veterinários na instituição do tratamento quimioterápico para essas pacientes, independente do acometimento linfonodal, visto que, nesses casos, apresentariam um comportamento “atípico”.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitiram concluir:

- ✓ Características histopatológicas, como matriz mixoide associada a tecido maduro, arranjo papilar, inflamação linfohistioplasmocitária, maior desmoplasia e menor quantidade de vasos peri e intratumorais podem contribuir como características preditivas de metástases em CTM I (+), e, portanto, para sua maior agressividade e comportamento “atípico”.
- ✓ As características clínicas e epidemiológicas como o tempo de detecção e tamanho dos carcinomas em tumores mistos de cadelas, grau I e II, refletem diretamente no prognóstico. Desta forma, quanto mais demorado o diagnóstico, maior o tamanho da neoplasia e, conseqüentemente, pior o prognóstico para a paciente;
- ✓ Carcinomas em tumores mistos grau I de cadelas com metástase para linfonodo possuem grande representatividade (25%) e são considerados “atípicos” por apresentarem características morfológicas, comprometimento nodal, menor sobrevida e necessidade de quimioterapia semelhante aos carcinomas em tumor misto grau II também com metástase nodal;
- ✓ As metástases para linfonodos regionais dos carcinomas em tumores mistos de cadelas são predominantemente caracterizadas por células isoladas cujo arranjo difere do tumor primário, independente do grau histológico;
- ✓ Cadelas diagnosticadas com carcinomas em tumores mistos grau I e II sem metástase apresentam taxa de sobrevida superior quando comparadas às cadelas com metástase para linfonodos regionais.
- ✓ Características morfológicas, como matriz mixoide associada a tecido maduro, arranjo papilar, inflamação linfohistioplasmocitária, maior desmoplasia e menor quantidade de vasos peri e intratumorais levam ao maior risco de óbito nos animais acometidos com carcinoma em tumor misto Grau I com metástase para linfonodo.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O carcinoma em tumor misto é um tipo histológico morfológicamente heterogêneo, caracterizado pela presença de diferentes tipos celulares, bem como elementos da matriz. Diversas combinações destes componentes, possivelmente, conferem diferentes comportamentos biológicos a este grupo histológico. Por isso, é pertinente investigar como essas diferentes combinações interferem na progressão de tumores com aspectos histológicos aparentemente “inofensivos”, classificados como grau I de acordo com a graduação adaptada de Elston e Ellis, 1991.

Acreditamos que investigações mais criteriosas possam ser realizadas no intuito de verificar se o atual sistema de graduação proposto para carcinomas mamários em cadelas não estaria subestimando os tumores aparentemente bem diferenciados (CTM grau I). A identificação de padrões morfológicos comuns em tumores com comportamentos considerados “atípicos”, ou seja, com baixa graduação histopatológica, mas metastáticos, pode ser de extrema relevância para entendimento do curso evolutivo dos CTM. Portanto, além da avaliação das células epiteliais, mioepiteliais e mesenquimais, é importante caracterizar os padrões de proliferação destas células, bem como destacar a presença de outros componentes da matriz extracelular, desmoplasia, processo inflamatório associado, angiogênese e invasão.

Este é o primeiro estudo que analisa, de forma exploratória, componentes clínico patológicos, com ênfase para características histomorfológicas do CTM, com o objetivo de melhor compreender o comportamento biológico dos CTM grau I e identificar fatores que estejam relacionados ao seu potencial metastático. Contudo, estudos adicionais são necessários para melhor entendimento sobre a progressão destes CTMs, que podem ser denominados “atípicos”.

9 REFERÊNCIAS

- ALENZA, P.; PEÑA, L.; CASTILLO, N. D.; NIETO, A. I. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. **Journal of Small Practice**, v.41, p.287-291, 2000.
- AL-MANSOUR, M. A.; KUBBA, M. A. G.; AL-AZREG, S. A.; DRIBIKA, S. A. Comparative histopathology and immunohistochemistry of human and canine mammary tumors. **Open Veterinary Journal**, v. 8, n. 3, p. 243–249, 2018. doi: 10.4314/ovj.v8i3.3.
- ARAÚJO, M. R. DE; CAMPOS, L. C.; FERREIRA, E.; CASSALI, G. D. Quantitation of the Regional Lymph Node Metastatic Burden and Prognosis in Malignant Mammary Tumors of Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 5, p. 1360–1367, 2015. doi: 10.1111/jvim.13576.
- AULER, P.; BERTAGNOLLI, A.; FERREIRA, E.; CAMPOS, G.; DIAS, A. P.; CAMPOS, C.; CAMPOS, L.; CASSALI, G. Myeloid metaplasia in canine mixed mammary tumors: Occurrence and characterization. **Veterinary Quarterly**, v. 31, n. 4, p. 173–177, 2011. doi: 10.1080/01652176.2011.649371.
- BLANKENSTEIN, T. The Role of Inflammation in Tumour Growth and Tumour Suppression. **Novartis Found Symp** , p.256-269, 2004.
- BERTAGNOLLI, A. C. **Tumores mamários mistos caninos: análise do dna mitocondrial e da expressão proteica de HER2 e EGFR nos componentes epitelial e mesenquimal**. 2009. 94f. Tese (Doutorado em Patologia). Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.
- BERTAGNOLLI, A. C.; FERREIRA, E.; DIAS, E. J.; CASSALI, G. D. Canine mammary mixed tumours: Immunohistochemical expressions of EGFR and HER-2. **Australian Veterinary Journal**, v. 89, n. 8, p. 312–317, 2011. doi: 10.1111/j.1751-0813.2011.00803.x.
- BREDHOLT, G.; MANNELQVIST, M.; STEFANSSON, I. M.; BIRKELAND, E.; BØ, T. H.; ØYAN, A. M.; TROVIK, J.; KALLAND, K. H.; JONASSEN, I.; SALVESEN, H. B.; WIK, E.; AKSLEN, L. A. Tumor necrosis is an important hallmark of aggressive endometrial cancer and associates with hypoxia, angiogenesis and inflammation responses. **Oncotarget**, v. 6, n. 37, p. 39676–39691, 2015. doi: 0.18632/oncotarget.5344 .
- CAMP, B. J.; DYHRMAN S. T.; MEMOLI, V. A.; MOTT, L. A.; BARTH JR, R. J. In situ cytokine production by breast cancer tumor-infiltrating lymphocytes. **Annals Surgical Oncology**, v.3, p.176-184, 1996.
- CASSALI, G. D. **Estudo morfológico, imuno-histoquímico e citométrico de tumores mamários da cadela – aspectos comparativos com as neoplasias da mama humana**. 2000, 72p. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, 2000.
- CASSALI, G. D. Comparative mammary oncology: canine model. **BMC Proceedings**, Águas de São Pedro, v. 7, n. K6, S1-S2, 2013.Supplement.
- CASSALI, G.D.; CAVALHEIRO BERTAGNOLLI, A.; FERREIRA, E.; ARAÚJO

DAMASCENO, K.; OLIVEIRA GAMBA, C. DE; BONOLO DE CAMPOS, C. Canine mammary mixed tumours: A review. **Veterinary Medicine International**, p. 1-7, 2012. doi:10.1155/2012/274608

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.; BATSCHINSKI, K.; TERRA, E. M.; SALVADOR, R. C. L. JARK, P. C.; DELECRODI, J. E. 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.; CINTRAL, 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**, v. 7, n. 2, p. 38–69, 2014.

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. S.; 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**, v. 10, n. 3, p. 87–99, 2017. doi: 10.24070/bjvp.1983-0246.v10i3p87-99.

CAVALCANTI, M. F.; CASSALI, G. D. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas – revisão. **Revista Clínica Veterinária**, v.61, p.56-63, 2006.

CHOI, Y.; LEE, H. J.; HYE, M.; MOON, J.; SANG, K.; JOO, E.; JEONG, H.; LEE, H. E.; PARK, S. Y. Epithelial-mesenchymal transition increases during the progression of in situ to invasive basal-like. **Human Pathology**, v. 44, n. 11, p. 2581–2589, 2013. doi: 10.1016/j.humpath.2013.07.003

CHOW, A.; ZHOU, W.; LIU, L. FONG, M. Y.; CHAMPER, J.; HAUTE, D. V.; CHIN, A. R.; REN, X.; GUGIU, B. G.; MENG, Z.; HUANG, W.; NGO, V.; KORTYLEWSKI, M.; WANG, S. E. Macrophage immunomodulation by breast cancer-derived exosomes requires toll-like receptor 2-mediated activation of NF- κ B. **Scientific Reports**, v.4, 5750, 2014.

CHRISTGEN, M.; STEINEMANN, D.; KÜHNLE, E.; LÄNGER, F.; GLUZ, O.; HARBECK, N.; KREIPE, H. Lobular breast cancer: Clinical, molecular and morphological characteristics. **Pathology Research and Practice**, v. 212, n. 7, p. 583–597, 2016. doi:10.1016/j.prp.2016.05.002.

CLAYTON, F. Pathologic correlates of survival in 378 lymph node-negative infiltrating ductal breast carcinomas. Mitotic count is the best single predictor. **Cancer** 1991, v.68, p.1309-1317.

CLEARY, M. P.; GROSSMAN, M. E.; RAY, A. Effect of obesity on breast cancer development. **Veterinary Pathology**, p.1-12, 2010. doi:10.1177/0300985809357753

COSTA JÚNIOR, J. S.; GOIOZO, P. F. I.; SILVA, E. O. Estudo epidemiológico de tumores de mama em cadelas na região do oeste paulista. **Colloquium Agrariae**, v. 12, n. 1, p. 27–31, 2016. doi: 10.5747/ca.2016.v12.n1.a130.

CONCEIÇÃO, A. M. S. **Fatores relacionados a supressão da resposta imunológica antitumoral em cadelas portadoras de carcinoma inflamatório mamário**. 2017. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos) Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, 2017.

D'ASSIS, M. J. M. H. **Avaliação dos biomarcadores imunológicos (razão de células T CD4+/CD8+ e expressão de MHC I por monócitos) em cadelas com carcinomas mamários**. 2017. 114p. Tese (Doutorado em Ciência Animal nos Trópicos) Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, 2017.

DALTON, L. W.; PAGE, D. L.; DUPONT, W. D. Histologic grading of breast carcinoma. A reproducibility study. **Cancer**, v. 73, n. 11, p. 2765–2770, 1994.

DAMASCENO, K. A. **Carcinomas em tumores mistos mamários caninos: Expressão de Versican e sua relação com invasão do estroma e com grau de diferenciação mioepitelial**. 2012. 113f. Tese (Mestrado em Patologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.

DAMASCENO, K. A.; BERTAGNOLLI, A. C.; ESTRELA-LIMA, A.; RABELO, B. S.; CAMPOS, L. C.; RIBEIRO, L. G. R.; CASSALI, G. D. Versican expression in myoepithelial cells from carcinomas in canine mixed mammary tumors. **Veterinary Journal**, v. 200, p. 146–151, 2014. doi: 10.1016/j.tvjl.2014.01.013.

DE LAS MULAS, M, J.; MILLAN, 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**, v. 42, n. 2, p. 200–212, 2005.

DENARDO, D.G.; COUSSENS, L.M. Review Inflammation and breast cancer: Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. **Breast Cancer Research**. v. 9, n. 4, 2007.

DEUGNIER, M. A.; TEULIÈRE, J.; FARALDO, M. M.; THIERY, J. P.; GLUKHOVA, M. A. The importance of being a myoepithelial cell. **Breast Cancer Research**, v. 4, n. 6, p. 224–230, 2002. doi:10.1186/bcr459.

DIAS, M. L. DE M.; ANDRADE, J. M. L.; CASTRO, M. B. DE; GALERA, P. D. Survival analysis of female dogs with mammary tumors after mastectomy: Epidemiological, clinical and morphological aspects. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 3, p. 181–186, 2016. doi: 10.1590/S0100-736X2016000300006.

- DUFFY, M. J.; MAGUIRE, T. M.; HILL, A.; MCDERMOTT, E.; O'HIGGINS, N. Metalloproteinases: Role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. **Breast Cancer Research**, v. 2, n. 4, p. 252–257, 2000.
- DUNNE, B.; GOING, J. J. Scoring nuclear pleomorphism in breast cancer. **Histopathology**, v. 39, p. 259–265, 2001.
- ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**, v 19, p. 403-410, 1991.
- ERDÉLYI, I.; ASTEN, A. J. A. M. VAN; DIJK, J. E. VAN; NEDERBRAGT, H. Expression of versican in relation to chondrogenesis-related extracellular matrix components in canine mammary tumors. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 124, p. 139–149, 2005. doi: 10.1007/s00418-005-0007-y.
- ERDÉLYI, I.; NIESKENS, D. H. M.; DIJK, J. E. VAN; VASS, L.; NEDERBRAGT, H. Immunohistochemical evaluation of versican, in relation to chondroitin sulphate, in canine mammary tumours. **Histology and Histopathology**, v. 18, n. 4, p. 1067–1080, 2003. doi: 10.14670/HH-18.1067.
- ESTRELA-LIMA, A.; ARAÚJO, M. S. S.; SOARES, R. P.; RIBEIRO, L. G. R.; DAMASCENO, K. A.; COSTA, A. T.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A.; CASSALI, G. D. Plasma biomarkers profile of female dogs with mammary carcinoma and its association with clinical and pathological features. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 14, n.1, p. 88–100, 2016. doi: 10.1111/vco.12070
- ESTRELA-LIMA, A.; ARAÚJO, M. S.; COSTA-NETO, J. M.; RIBEIRO, L. G. R.; DAMASCENO, K. A.; D'ASSIS, M. J. M.; MARTISN-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G. D. Understanding of the immunological heterogeneity of canine mammary carcinomas to provide immunophenotypic features of circulating leukocytes as clinically relevant prognostic biomarkers. **Breast Cancer Research Treatment**, v.131, n. 3, p.751–763, 2012. doi: 10.1007/s10549-011-1452-z.
- ESTRELA-LIMA, A.; ARAÚJO, M. S. S.; COSTA-NETO, J. M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; BARROUIN-MELO, S. M.; CARDOSO, S. V.; MARTINS-FILHO, O. A.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G. D. Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. **BioMed Central Cancer**, v. 10, n 256, p. 1-14, 2010.
- FERREIRA, E.; BERTAGNOLLI, A.C.; CAVALCANTI, M.F.; SCHMITT, F.C.; CASSALI, G.D. The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**. v. 7, p.1-6, 2009. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2009.00193.x>
- FURIAN, M.; SANDEI, C. F. C. S.; ROCHA, E. J. N.; LOT, R. F. E. Estudos retrospectivo dos tumores mamários em caninos e felinos atendidos no Hospital Veterinário da FAMED entre 2003 a 2007. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 4, n. 8, 2007.

- GAMA, A.; PAREDES, J.; GÄRTNER, F.; ALVES, A.; SCHMITT, F. Expression of E-cadherin, P-cadherin and β -catenin in canine malignant mammary tumours in relation to clinicopathological parameters, proliferation and survival. **The Veterinary Journal**, v. 177, p. 45–53, 2008. doi:10.1016/j.tvjl.2007.05.024
- GENELHU, M. C. L. S.; CARDOSO, S. V.; GOBBI, H.; CASSALI, G. D. A comparative study between mixed-type tumours from human salivary and canine mammary glands. **BioMed Central Cancer**, v. 7, n. 218, p. 1–9, 2007. doi: 10.1186/1471-2407-7-218.
- GERALDES, M.; GÄRTNER, F.; SCHMITT, F. Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours. **Veterinary Record**, v. 146, p. 403–406, 2000.
- GOLDSCHMIDT, M.; PEÑA, L.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V. Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v.48, n.1, p.117-131, 2011. doi: 10.1177/0300985810393258.
- GRUBER, G.; GREINER, R.H.; HLUSHCHUK, R.; AEBERSOLD, D.M.; ALTERMATT, H.J.; BERCLAZ, G.; DJONOV, V. Hypoxia-inducible factor 1 alpha in high-risk breast cancer: an independent prognostic parameter? **Breast cancer research**, v.6, n.3, 2004. doi: <https://doi.org/10.1186/bcr775>.
- GUDJONSSON, T.; RØNNOV-JESSEN, L.; VILLADSEN, R.; RANK, F.; BISSELL, M. J.; PETERSEN, O. W. Normal and tumor-derived myoepithelial cells differ in their ability to interact with luminal breast epithelial cells for polarity and basement membrane deposition. **Journal of Cell Science**, v. 115, n. 1, p. 39–50, 2002.
- GUJAM, F. J. A.; EDWARDS, J.; MOHAMMED, Z. M. A.; GOING, J. J.; MCMILLAN, D. C. The relationship between the tumour stroma percentage, clinicopathological characteristics and outcome in patients with operable ductal breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 111, n. 1, p. 157–165, 2014.
- HAHN, K.A.; RICHARDSON, R. C.; KNAPP, D. W. Canine malignant mammary neoplasia: biological behavior, diagnosis, and treatment alternatives. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 28, n. 3, p. 251-256, 1992.
- HELLMÉN, E., LINDGREN, A. The expression of intermediate filaments in canine mammary glands and their tumors. **Veterinary Pathology**, v. 26, n.5, p.420–428, 1989
- HEYS, S. D.; STEWART, K. N.; MCKENZIE, E. J. Miller, I.D.; WONG, S.Y.C.; GRANT, S.; REES, A.J. Characterisation of tumour-infiltrating macrophages: impact on response and survival in patients receiving primary chemotherapy for breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, 2012. 10p.
- JEONG, Y.J.; OH, H.K.; PARK, S.H.; BONG, J.G. Association between inflammation and cancer stem cell phenotype in breast cancer. **Oncology Letters**, v.15, p.2380-2386, 2018. doi: 10.3892/ol.2017.7607

JONES, J. L.; SHAW, J. A.; PRINGLE, J. H.; WALKER, R. A. Primary breast myoepithelial cells exert an invasion-suppressor effect on breast cancer cells via paracrine down-regulation of MMP expression in fibroblasts and tumour cells. **Journal of Pathology**, v. 201, n. 4, p. 562–572, 2003. doi: 10.1002/path.1483.

JOSHI, S.; SINGH, A. R.; ZULCIC, M.; BAO, L.; MESSER, K.; IDEKER, T.; DUTKOWSKI, J.; DURDEN, D.L. Rac2 controls tumor growth, metastasis and M1-M2 macrophage differentiation in vivo. **PLoS ONE**, v.9, n.4, e95893, 2014.

KLIMP, A. H.; VRIES, E. G. E.; SCHERPHOF, G. L.; DAEMEN, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v.44, p.143-161, 2002. doi: 10.1016/S1040-8428(01)00203-7

KARAYANNOPOULOU, M.; KALDRYMIDOU, E.; CONSTANTINIDIS, T. C.; DESSIRIS, A. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: Application of a human grading method. **Journal of Comparative Pathology**, v. 133, p. 246–252, 2005. doi:10.1016/j.jcpa.2005.05.003.

KIM, J. H.; HUR, J. H.; LEE, S. M.; IM, K.S.; KIM, N.H.; USR, J.H. Correlation of Foxp3 positive regulatory T cells with prognostic factors in canine mammary carcinomas. **The Veterinary Journal**, v.193, p.222-227, 2012. doi: 10.1016/j.tvjl.2011.10.022.

KRUIJF, E. M. DE; NES, J. G. H. VAN; VELDE, C. J. H. VAN DE; PUTTER, H.; SMIT, V. T. H. B. M.; LIEFERS, G. J.; KUPPEN, P. J. K.; TOLLENAAR, R. A. E. M.; MESKER, W. E. Tumor-stroma ratio in the primary tumor is a prognostic factor in early breast cancer patients, especially in triple-negative carcinoma patients. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 125, n. 3, p. 687–696, 2011. doi: 10.1007/s10549-010-0855-6.

LANA, S. E.; RUTTEMAN, G. R.; WITHROW, S. J. Tumors of the Mammary Gland. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. 4.ed. St. Louis: Saunders Elsevier, p.619-636, 2007.

LAVALLE, G. E.; BERTAGNOLLI, A. C.; TAVARES, W. T.; CASSALI, G. D. COX-2 expression in canine mammary carcinomas: Correlation with Angiogenesis and Overall Survival. **Veterinary Pathology**, v. 46, n. 6, p. 1275-1280, 2009. doi: 10.1354/vp.08-VP-0226-C-FL.

LEE, J. H.; KIM, E. K.; CHOI, S.; NAM, K. J.; KIM, D. C.; CHO, S. H. Metaplastic breast carcinoma with extensive osseous differentiation: A case report. **Breast**, v. 17, p. 314–316, 2008. doi:10.1016/j.breast.2007.09.006.

LIN, W. W.; KARIN, M. A. Cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 117, n. 5, p.1175- 1183, 2007. doi: 10.1172/JCI31537.

LUBKIN, S. R.; JACKSON, T. Multiphase mechanics of capsule formation in tumors. **Journal of Biomechanical Engineering**, v. 124, n. 2, p. 237–243, 2002. doi: 10.1115/1.1427925.

MACHADO, M. C.; COSTA-NETO, J. M. DA; PORTELA, R. D.; D'ASSIS, M. J. M. H.; MARTINS-FILHO, O. A.; BARROUIN-MELO, S. M.; BORGES, N. F.; SILVA, F. L.; ESTRELA-LIMA, A. The effect of naltrexone as a carboplatin chemotherapy-associated drug on the immune response, quality of life and survival of dogs with mammary carcinoma. **PLoS ONE**, v. 13, n. 10, p. 1–16, 2018. doi: 10.1371/journal.pone.0204830

MAN, Y-G. Focal degeneration of aged or injured myoepithelial cells and the resultant auto-immunoreactions are trigger factors for breast tumor invasion. **Medical Hypotheses**, v. 69, n. 6, p. 1340–1357, 2007. doi:10.1016/j.mehy.2007.02.031.

MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; LOCATI, M. et al. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Immunology**, v.23, p. 549-555, 2002.

MAO, Y.; QU, Q.; CHEN, X.; HUANG, O.; WU, J.; SHEN, K. The prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. **Plos One**, v.11, n.4, 2016. doi: 0.1371/journal.pone.0152500.

MARTINS, A. M. C. R. P. F.; TAMASO, E.; GUERRA, J. L. Retrospective review and systematic study of mammary tumors in dogs and characteristics of the extracellular matrix. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.39, n.1, p.38-42, 2002. doi: 10.1590/S1413-95962002000100007.

MCMULLEN, E. R.; ZOUMBEROS, N. A.; KLEER, C. G. Metaplastic Breast Carcinoma: Update on Histopathology and Molecular Alterations. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 143, p. 1492–1496, 2019. doi: 10.5858/arpa.2019-0396-RA.

MISDORP, W.; ELSE, R. W.; HELLMÉN, E. Definitions and explanatory notes. In: _____. **Who Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and Cat**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology. Cap. 3. p. 18-27, 1999.

MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in domestic animals**. 4. ed. Iowa State: University of California, p. 575-606, 2002.

MONTEIRO, L. N.; RODRIGUES, M. A.; GOMES, D. A.; SALGADO, B. S.; CASSALI, G. D. Tumour-associated macrophages: Relation with progression and invasiveness, and assessment of M1/M2 macrophages in canine mammary tumours. **Veterinary Journal**, v. 234, n. 2010, p. 119–125, 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.02.016>

MULLIGAN, R. M. Mammary cancer in the Canine dog: a study of 120 cases. **American Journal of Veterinary Research**, v. 36, n. 9, p. 1391-1396, 1975.

NGUYEN, M.; LEE, M. C.; WANG, J. L.; TOMLINSON, J. S.; SHAO, Z. M.; ALPAUGH, M. L.; BARSKY, S. H. The human myoepithelial cell displays a multifaceted anti-angiogenic phenotype. **Oncogene**, v. 19, n. 31, p. 3449–3459, 2000. doi: 10.1038/sj.onc.1203677.

NUNES, F. C.; DAMASCENO, K. A.; CAMPOS, C. B. DE; BERTAGNOLLI, A. C.; LAVALLE, G. E.; CASSALI, G. D. Mixed tumors of the canine mammary glands: Evaluation of prognostic factors, treatment, and overall survival. **Veterinary and Animal**

Science, v. 7, p. 100039, 2019. doi: 10.1016/j.vas.2018.09.003.

OLIVEIRA FILHO, J. C.; KOMMERS, G. D.; MASUDA, E. K.; MARQUES, B. 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**, v. 30, n. 2, p. 177–185, 2010.

OLIVEIRA, L. O.; OLIVEIRA, R. T.; LORETTI, A. P.; RODRIGUES, R.; DRIEMEIER, D. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, n. 2, p. 105-110, 2003.

ONO, M. Review Article Molecular links between tumor angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy. **Cancer Science**, v. 99, n.8, p. 1501–1506, 2008.

OWEN, L. **TNM Classification of tumours in domestic animals**. 5 ed. Geneva, World Health Organization, 1980, 52 p.

PANDEY, P. R.; SAIDOU, J.; WATABE, K. Role of myoepithelial cells in breast tumor progression. **Frontiers in Bioscience**, v. 15, n. 1, p. 226–236, 2011.

PATEL, M. P.; GHODASARA, D. J.; RAVAL, S. H.; JOSHI, B. P. Incidence, Gross Morphology, Histopathology and Immunohistochemistry of Canine Mammary Tumors. **The Indian Journal of Veterinary Sciences and Biotechnology**, v. 14, n. 04, 2019. doi: 10.21887/ijvsbt.14.4.11.

PATEL, S.; MASO, C. J. Ossification in Metastases from Carcinoma of the Breast. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 198, n. 12, p. 1309–1311, 1966.

PELETEIRO, M. C. Tumores mamários na cadela e na gata. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.89, n.509, p.10-29, 1994.

PEÑA, L.; DE ANDRÉS, P. J.; CLEMENTE, M.; CUESTA, P.; PÉREZ-ALENZA, M. D. 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**, v. 50, n. 1, p. 94–105, 2013. doi: 10.1177/0300985812447830.

PHILIBERT, J. C.; SNYDER, P. W.; GLICKMAN, N. ; GLICKMAN, L. T.; KNAPP D. W.; WATERS D. J. Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 17, n. 1, p. 102-106, 2003.

PINHO, I. S. S. **Fenótipos Diferentes de uma Neoplasia Comum - Carcinoma Metaplásico da Mama com diferenciação condróide**. 2017. 42p. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina) - Faculdade de Medicina Lisboa, Universidade de Lisboa, 2017.

POLAMRAJU, P.; HAQUE, W.; CAO, K.; VERMA, V.; SCHWARTZ, M.; KLIMBERG, V. S.; HATCH, S.; NIRAVATH, P.; BUTLER, E. B.; TEH, B. S. Comparison of outcomes between metaplastic and triple-negative breast cancer patients. **The Breast**, v. 49, p. 8–16,

2020. doi:10.1016/j.breast.2019.10.003

PRIESTER, W. A. Occurrence of mammary neoplasm in bitches in relation to breed, age, tumour type, and geographical region from which reported. **Journal of Small Animal Practice**, v. 20, p. 1-11, 1979.

RAKHA, E. A.; ELLIS, I. O. Modern classification of breast cancer: Should we stick with morphology or convert to molecular profile characteristics. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 18, n. 4, p. 255–267, 2011.

RAHMANZADE, R. Redefinition of tumor capsule: Rho-dependent clustering of cancer-associated fibroblasts in favor of tensional homeostasis. **Medical Hypotheses**, v. 135, p. 1-4, 2020. doi: 109425, 2020. 10.1016/j.mehy.2019.109425.

RAMALHO, L. N. Z.; RIBEIRO-SILVA, A.; CASSALI, G. D.; ZUCOLOTO, S. The expression of p63 and cytokeratin 5 in mixed tumors of the canine mammary gland provides new insights into the histogenesis of these neoplasms. **Veterinary Pathology**, v. 43, n. 4, p. 424–429, 2006.

RASOTTO, R.; BERLATO, D.; GOLDSCHMIDT, M. H.; ZAPPULLI, V. Prognostic Significance of Canine Mammary Tumor Histologic Subtypes: An Observational Cohort Study of 229 Cases. **Veterinary Pathology**, v. 54, n. 4, p. 571–578, 2017. doi: 10.1177/0300985817698208.

RAUBER D. **Características clinicopatológicas e prognóstico das neoplasias mamárias produtoras de matriz em cadelas**. 2017. 115p. Dissertação (mestrado) - Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária - Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, 2017.

RIBEIRO, G. M.; BERTAGNOLLI, A. C.; ROCHA, R. M.; CASSALI, G. D. Morphological aspects and immunophenotypic profiles of mammary carcinomas in benign-mixed tumors of female dogs. **Veterinary Medicine International**, v. 2012, p. 1-7 2012. doi:10.1155/2012/432763.

RIBEIRO, L. G. R.; DAMASCENO, K.; COSTA NETO, J.M.; D'ASSIS, M. J. M. H.; COSTA, A. T.; SILVA, N. S.; AGUIAR, P. H. P.; CASSALI, G. D.; ESTRELA-LIMA, A. Expressão da Cox-2 nos carcinomas mamários de cadela. **Veterinária em Foco**, v.6, n. 2, p.134-139, jan./jun. 2009.

ROBBINS, P.; PINDER, S.; KLERK, N.; DAWKINS, H.; HARVEY, J.; STERRETT, G.; ELLIS, I.; ELSTON, C. Histological grading of breast carcinomas: A study of interobserver agreement. **Human Pathology**, v. 26, n. 8, p. 873–879, 1995.

RONCATI, L.; BARBOLINI, G.; PIACENTINI, F.; PISCIOLI, F.; PUSIOL, T.; MAIORANA, A. Prognostic Factors for Breast Cancer: an Immunomorphological Update. **Pathology and Oncology Research**, v. 22, p. 449–452, 2016. doi: 10.1007/s12253-015-0024-7.

SAAD, E. S. A.; LAM, J. S. Y.; AL-KHAN, A. A.; TAYEBI, M.; DAY, M. J.;

RICHARDSON, S. J.; DANKS, J. A. A Comparative Review of Mixed Mammary Tumors in Mammals. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 24, p. 125-137, 2018. doi:10.1007/s10911-018-9422-2.

SAAD, E. S.; MILLEY, K. M.; AL-KHAN, A. A.; NIMMO, J. S.; BACCI, B.; TAYEBI, M.; DAY, M. J.; RICHARDSON, S. J.; DANKS, J. A. Canine Mixed Mammary Tumour as a Model for Human Breast Cancer with Osseous Metaplasia. **Journal of Comparative Pathology**, v. 156, n. 4, p. 352–365, 2017. doi: 10.1016/j.jcpa.2017.03.005.

SANTOS, S.C.A. Padrão de incidência e análise espacial de tumor de mama em cadelas. 2020, 86p. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Ciência Animal nos Trópicos). Universidade Federal da Bahia, 2020.

SARLI, G.; PREZIOSI, R.; BENAZZI, C.; CASTELLANI, G.; MARCATO, P. S. Prognostic value of histologic stage and proliferative activity in canine malignant mammary tumors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 14, p. 25–34, 2002.

SCHNEIDER, R.; DORN, C. R.; TAYLOR, D. O. N. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. **Journal of the National Cancer Institute**, v.43, p.1249-1261, 1969.

SILVA, A. E.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G. D. Carcinogênese Hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. **Revista Ciência Rural**, v. 34, p. 625-633, 2004.

STANTON, S.E.; DISIS, M.L. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. **Journal for Immunotherapy of cancer**. v.4, n.59, 2016

STEWART, T. H. M.; HEPPNER, G. H. Immunological enhancement of breast cancer. **Parasitology**, Cambridge, v. 115, p. S141-S153, 1997. Supplement. doi:10.1017/s0031182097001832.

SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. **The Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 33, p. 573–596, 2003. doi:10.1016/S0195-5616(03)00020-2.

SOUZA, T. A.; CAMPOS, C. B.; GONÇALVES, A. B. B.; NUNES, F. C.; MONTEIRO, L. N.; VASCONCELOS, R. O.; CASSALI, G. D. Relationship between the inflammatory tumor microenvironment and different histologic types of canine mammary tumors. **Research in Veterinary Science**, v. 119, n. 2017, p. 209–214, 2018. doi:10.1016/j.rvsc.2018.06.012

TAKALA, S.; HEIKKILÄ, P.; NEVANLINNA, H.; BLOMQVIST, C.; MATTSON, J. Metaplastic carcinoma of the breast: Prognosis and response to systemic treatment in metastatic disease. **Breast Journal**, v. 25, p. 418–424, 2019. doi: 10.1111/tbj.13234

THIERY, J. P. Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p. 442–454, 2002. doi:10.1038/nrc822

THUN, M. J.; HENLEY, S. J.; GANSLER, T. Inflammation and cancer: an epidemiological perspective. **Novartis Found Symposium**, v. 256, p. 6-21, 2004.

<https://doi.org/10.1002/0470856734.ch2>

TOLEDO, G. N.; FELICIANO, M. A. R.; USCATEGUI, R. A. R.; MAGALHÃES, G. M.; MADRUGA, G. M.; VICENTE, W. R. R. Tissue fibrosis and its correlation with malignancy in canine mammary tumors. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 31, n. 4, p. 295–303, 2018. doi: 10.17533/udea.rccp.v31n4a06

TORÍBIO, J. M. M. L.; LIMA, A. E.; FILHO, E. F. M.; RIBEIRO, L. G. R.; D'ASSIS, M. J. M. H.; TEIXEIRA, R. G.; DAMASCENO, K. A.; CASSALI, G. D.; NETO, J. M. C.

Caracterização clínica, diagnóstico histopatológico e distribuição geográfica das neoplasias mamárias em cadelas de salvador, Bahia. **Revista Ceres**, v. 59, n. 4, p. 427–433, jul/ago, 2012.

VAN DIEST P.J.; BAAK, J.P.; MATZE-COK, P.; WISSE-BREKELMANS, E.C.; VAN GALEN, C.M.; KURVER, P.H.; BELLOT, S.M.; FIJNHEER, J.; VAN GORP, L.H.; KWEE, W.S.; LOS, J.; PETERSE, J.L.; RUITENBERG, H.M.; SCHAPERS, R.F.M.; SCHIPPER, M.E.I.; SOMSEN, J.G.; WILLIG, A.W.P.M.; ARIENS, A T.H. Reproducibility of mitosis counting in 2.469 breast cancer specimens: results from the Multicenter Morphometric Mammary Carcinoma Project. **Human Pathology**, 1992, v.23, p.603-607. doi: 10.1016/0046-8177(92)90313-R.

VIEIRA-FILHO, C. H. C.; BARROUIN-MELO, S. M.; DAMASCENO, K. A.; ARAÚJO, M. S. S.; BORGES, N. F.; SILVA, F. L.; CASSALI, G. D.; ESTRELA-LIMA, A. Tumor-associated macrophage is correlated with survival and SOCS protein expression in canine mammary carcinoma. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 10, p. 1972–1980, 2018. doi: 10.1590/1678-5150-PVB-5638.

VOORWALD, F. A.; TIOSSO, C. F.; TONIOLLO, G. H. Gonadectomia pré-puberal em cães e gatos. **Ciência. Rural**. v.43, n.6, p.1082-1091, 2013. doi: 10.1590/S0103-84782013005000059.

WARGOTZ, E. S.; NORRIS, H. J. Metaplastic carcinomas of the breast: V. Metaplastic carcinoma with osteoclastic giant cells. **Human Pathology**, v. 21, n. 11, p. 1142–1150, 1989.

WAPNIR, I. L.; BARNARD, N.; WARTENBERG, D.; GRECO, R. S. The inverse relationship between microvessel counts and tumor volume in breast cancer. **Breast Journal**, v. 7, n. 3, p. 184–188, 2001. doi: 10.1046/j.1524-4741.2001.007003184.x

YAMAGAMI, T.; KOBAYASHI, T.; TAKAHASHI, M.; SUGIYAMA, M. Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 58, n. 11, p. 1079–1083, 1996.

ANEXOS

Anexo 1: Estadiamento clínico (TNM) de tumores mamários caninos modificado de Sorenmo et al. (2013).

T – Tamanho do tumor primário			
	T1: < 3 cm		
	T2: 3-5 cm		
	T3: >5 cm		
N – Metástase linfonodo regional			
	N0: sem metástase – exame histopatológico		
	N1: presença de metástase – exame histopatológico		
M – Metástase a distância			
	M0: sem metástase		
	M1: presença de metástase		
	T	N	M
ESTADIO I	T1	N0	M0
ESTADIO II	T2	N0	M0
ESTADIO III	T3	N0	M0
ESTADIO IV	Qualquer tamanho	N1	M0
ESTADIO V	Qualquer tamanho	N0/N1	M1

Anexo 2: Graduação histológica de tumores de mama de acordo com Elston e Ellis (1991).

ATRIBUTO	AVALIAÇÃO	ESCORE
Formação tubular	>75% do tumor	1
	10 a 75% do tumor	2
	<10% do tumor	3
Pleomorfismo nuclear	Tamanho nuclear similar à célula normal	1
	Moderado aumento de tamanho e variação	2
	Marcada variação	3
Contagem mitótica em dez campos de alta potência (CAP)*	0 a 8 mitoses / 10 CAP	1
	9-16 mitoses / 10 CAP	2
	17 ou mais mitose / 10 CAP	3

*Adaptado de acordo com microscópio: 0,55mm – Olympus BX – 41. Objetiva de 40x

CAP: Campo de alta potência

Anexo 3: Protocolo do Comitê de Ética em Experimentação Animal

Universidade Federal da Bahia
Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia
Comitê de Ética no Uso de Animais

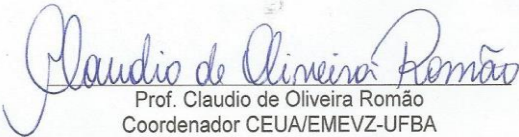
Av. Ademar de Barros, 500 - Ondina-40170-110 Salvador-BA
 Fone: (071) 3283-6701/6702/6718
 E-mail: ceua.ufba@hotmail.com

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **“Caracterização molecular e avaliação da transição epitélio-mesênquima nos carcinomas em tumores mistos da mama de cadelas e sua correlação com fatores prognósticos”**, registrada com o nº **62/2019**, sob a responsabilidade da Prof. **Alessandra Estrela Lima**, e 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 da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, em reunião de **16.08.2019**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa () Extensão
Vigência da autorização	02/10/2019 à 29/02/2020
Espécie/linhagem/raça	<i>Canis Lúpus familiaris</i>
Nº de animais	Não informado
Peso/Idade	2 à 50kg / 1 à 17 anos
Sexo	Ambos
Origem	Laboratório de Patologia Veterinária - UFBA

Salvador, 16/08/2019.


 Prof. Claudio de Oliveira Romão
 Coordenador CEUA/EMEVZ-UFBA