



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E ANATOMO-PATOLÓGICO DE TUMORES  
MAMÁRIOS NA CADELA E NA GATA

MÓNICA MENDES COSTA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

ORIENTADOR

DOUTOR MÁRIO ANTÓNIO DA SILVA SOARES DE PINHO

DOUTOR JORGE MANUEL DE JESUS CORREIA

DOUTOR JOSÉ MANUEL ANTUNES FERREIRA DA SILVA

DOUTOR JORGE MANUEL DE JESUS CORREIA

2010

LISBOA

---





UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E ANATOMO-PATOLÓGICO DE TUMORES  
MAMÁRIOS NA CADELA E NA GATA

MÓNICA MENDES COSTA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

DOUTOR MÁRIO ANTÓNIO DA SILVA SOARES DE PINHO

DOUTOR JOSÉ MANUEL ANTUNES FERREIRA DA SILVA

DOUTOR JORGE MANUEL DE JESUS CORREIA

ORIENTADOR

DOUTOR JORGE MANUEL DE JESUS CORREIA

2010

LISBOA

---

## Agradecimentos

Ao Professor Doutor Jorge de Jesus Correia, que durante o período de estágio foi sempre um orientador muito dedicado e pronto a ajudar, transmitindo sempre da melhor forma possível os seus conhecimentos. A realização desta tese não seria possível sem o seu auxílio;

À Professora Doutora Conceição Peleteiro, por estar sempre pronta a ensinar, auxiliando-me nas actividades desenvolvidas durante o estágio;

Aos Professores Doutores Mário Pinho, Fernando Afonso, José Ferreira da Silva e Dr. Hugo Pissarra, pelo apoio fornecido durante a realização da tese;

Ao Professor Doutor Victor Alves, por me ter apoiado durante o curso;

Ao Professor Doutor Fernando Durão, por me ter ajudado na parte estatística dos resultados;

À D. Maria Augusta, por estar sempre com boa disposição;

Às técnicas Maria do Rosário e Sandra, pela ajuda fornecida na realização das técnicas de processamento histopatológico;

À técnica Manuela, pela dedicação demonstrada durante o estágio;

A toda a equipa de bioquímica, por me terem acompanhado durante o período de estágio;

À Bruna Silva, que tanto me ajudou nos aspectos informáticos da tese e por ter sido, ao longo destes anos, uma grande amiga;

À Alexandra Mira, Joana Cuba e Ana Sofia Borralho por me terem acompanhado durante o curso e serem grandes amigas;

Aos meus outros amigos que, embora não partilhando o mesmo curso, sempre me apoiaram;

Aos meus cães, particularmente ao Mickey, que tanto contribuíram para a minha motivação enquanto estudante de medicina veterinária;

À minha família, um agradecimento muito especial, nomeadamente aos meus pais, irmã, avós, tios e primos mais próximos, que sempre me apoiaram durante a minha vida. Se não fosse pelos seus ensinamentos e apoio, nada do que alcancei até agora seria possível.



## Resumo

As neoplasias mamárias estão descritas como sendo as segundas e terceiras neoplasias com maior taxa de incidência na espécie canina e felina, respectivamente, sendo portanto muito frequentes. Para além disso, comumente representam uma das causas de morte dos animais domésticos, devido à capacidade de metastização elevada que acompanha muitas das neoplasias mamárias malignas. Para uma melhor compreensão dos aspectos epidemiológicos relacionados com estes tumores foi realizado um estudo que engloba as análises histopatológicas de glândula mamária efectuadas em 588 animais (364 cães e 224 gatos) no período de tempo compreendido entre 1 Janeiro de 2009 e 30 de Junho de 2010, no Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa. No presente estudo, verificou-se que as neoplasias mamárias malignas constituíam a patologia observada com maior frequência, tanto na espécie canina como na felina. Ao ser analisada a idade dos animais afectados por tumores mamários, obteve-se uma média de idades de 9,8 anos no cão, enquanto no gato este valor correspondia a 10,5 anos. Tendo em conta a raça dos pacientes, não foi possível concluir acerca da existência de qualquer predisposição rácica para o desenvolvimento destas neoplasias. Considerando a classificação em misto/não misto das neoplasias mamárias da espécie canina, observou-se uma maior percentagem de tumores malignos não mistos relativamente aos mistos. No entanto, no caso dos tumores benignos foi verificado o oposto. Aquando da análise do tipo histológico tumoral e no que diz respeito aos carcinomas, verificou-se um predomínio do tipo cribriforme no gato, enquanto no cão o tipo mais frequente era o tubular. Porém, concluiu-se que, em ambas as espécies, todos os adenomas eram de tipo tubular. Atendendo à avaliação dos graus de malignidade histológica, a maioria dos carcinomas mamários da espécie felina correspondia ao grau III, embora, considerando os canídeos, o grau II fosse o mais frequente. Para além disso, no caso dos gatos e ao contrário do que sucede nos cães, todos os casos em que foi observada permeação vascular por células neoplásicas estavam associados à existência de metástases nos linfonodos regionais analisados. Pode concluir-se que os resultados obtidos corroboram, no geral, com os descritos por outros autores.

*Palavras-chave:* neoplasia mamária; cão; gato; histopatologia; epidemiologia.

## **Abstract**

Mammary neoplasms are very common in dogs and cats, being the second and the third most frequent tumors in the canine and feline species, respectively. Their high metastatic ability, characteristic of the malignant form, makes them one of the main causes of death in domestic animals. Regarding the epidemiological characterization of these tumors, a study was done based on histopathologic analysis related to the mammary glands of 588 animals (364 dogs and 224 cats) performed in the Laboratory of Pathology of the Faculty of Veterinary Medicine, Technical University of Lisbon between 1<sup>st</sup> of January, 2009 and 30<sup>th</sup> of June, 2010. In the present study, the malignant neoplasm was the most frequently observed pathologic process of the mammary gland. Concerning the age of the animals affected by mammary tumors, the average was 9,8 years in dogs and 10,5 years in cats. Considering canine and feline breeds, no breed predisposition to develop these tumors was found. Regarding the mixed/non mixed classification of canine mammary tumors, there was a higher incidence of non mixed malignant tumors in comparison to the mixed ones, while in respect to the benign form the opposite was verified. Atending to the histological classification of mammary tumors, the most common histological types of carcinoma were the cribriforme type in the cat and the tubular type in the dog. However, all the adenomas corresponded to the tubular type in both species. Considering the histological grade of malignancy, in respect to the feline species there was a higher incidence of grade III, while in dogs the grade II was the most frequent one. Besides this, in the cat and in opposition to the dog, all the cases associated with vascular invasion by neoplastic cells were accompanied by lymph node metastasis. As a conclusion, it was verified that the majority of these results were similar to the ones found by other authors.

*Keywords:* mammary neoplasm; dog; cat; histopathology; epidemiology.

# Índice Geral

Agradecimentos .....	i
Resumo .....	iii
Abstract .....	iv
Índice Geral .....	v
Índice de Gráficos .....	vi
Índice de Tabelas .....	viii
Índice de Abreviaturas e de Símbolos .....	ix
I. Introdução geral .....	1
II. Revisão bibliográfica .....	3
1. Introdução .....	3
2. Dados epidemiológicos .....	7
2.1. Cão .....	7
2.2. Gato .....	10
3. Etiologia .....	13
3.1. Factores hormonais e respectivos receptores .....	13
3.2. Factores genéticos .....	18
3.3. Outros factores .....	23
4. Diagnóstico .....	25
4.1. Diagnóstico clínico e características macroscópicas .....	25
4.2. Diagnóstico citológico .....	28
4.3. Diagnóstico histopatológico .....	30
5. Metastização e invasão tumorais .....	37
6. Prognóstico .....	43
III. Estudo da patologia presente nas glândulas mamárias de canídeos e felídeos domésticos. ....	48
1. Objectivos .....	48
2. Material e métodos .....	48
3. Resultados .....	49
3.1. Caracterização da amostra populacional .....	49
3.2. Comparação entre tumores mamários benignos e malignos .....	59
3.3. Tumores malignos .....	76
4. Discussão .....	82
5. Conclusão .....	86
6. Bibliografia .....	88
Anexo I – Resultados adicionais .....	102
Anexo II - Informações adicionais (Estatística do teste de Qui-quadrado) .....	119
Anexo III - Informações adicionais (Protocolos) .....	120
Anexo IV - Informações adicionais (Registo das 21 raças mais frequentes de 2009; Clube Português de Canicultura) .....	122

## Índice de Gráficos

Gráfico 1. Caracterização e distribuição da patologia presente ao nível das glândulas mamárias, nos cães.....	50
Gráfico 2. Distribuição etária dos canídeos com tumores mamários. ....	51
Gráfico 3. Caracterização e distribuição da patologia presente nas glândulas mamárias dos gatos.....	55
Gráfico 4. Distribuição etária dos gatos com neoplasias mamárias.....	56
Gráfico 5. Distribuição dos tumores mamários malignos e benignos nos canídeos. ....	60
Gráfico 6. Distribuição etária dos canídeos com tumores mamários malignos e benignos...	61
Gráfico 7. Avaliação do número de mamas afectadas por tumores mamários malignos e benignos, nos canídeos. ....	62
Gráfico 8. Classificação dos carcinomas e adenomas mamários em complexo/simples.....	63
Gráfico 9. Classificação dos tumores mamários malignos e benignos em misto/não misto..	65
Gráfico 10. Distribuição dos adenomas e carcinomas mamários em função do tipo histológico, nos canídeos.....	67
Gráfico 11. Distribuição dos tumores mamários benignos e malignos nos felídeos. ....	70
Gráfico 12. Distribuição etária dos gatos com tumores mamários benignos e malignos. ....	71
Gráfico 13. Avaliação do número de mamas afectadas por tumores mamários malignos e benignos, nos gatos.....	72
Gráfico 14. Distribuição dos carcinomas e adenomas mamários em função do tipo histológico, nos gatos. ....	74
Gráfico 15. Caracterização dos graus de malignidade dos carcinomas mamários, nos canídeos. ....	77
Gráfico 16. Comparação entre os parâmetros permeação vascular/metástases nos linfonodos regionais, nos canídeos. ....	78
Gráfico 17. Caracterização dos graus de malignidade dos carcinomas mamários, nos felídeos.....	79
Gráfico 18. Comparação entre os parâmetros permeação vascular/metástases nos linfonodos regionais, nos felídeos.....	81

## Índice de figuras

Figura 1. Glândula mamária normal (original). .....	6
Figura 2. Cadáver de cadela com massa tumoral mamária, com cerca de 20 cm de diâmetro (original).....	27
Figura 3. Corte sagital da massa tumoral da figura anterior (original). .....	27
Figura 4. Metástases pulmonares de neoplasia mamária, em cadela (original). .....	41
<b>Figura 5.</b> Metástase de neoplasia mamária localizada ao nível do encéfalo, em cadela (original).....	42
Figura 6. Metástases de neoplasia mamária localizadas a nível pulmonar e pleural, em gata (original).....	42
Figura 7. Alteração fibroadenomatosa (lesão não tumoral) (original). .....	55
Figura 8. Carcinoma mamário complexo (original). .....	64
<b>Figura 9.</b> Tumor benigno misto (original).....	65
Figura 10. Carcinoma de tipo sólido (original). .....	67
Figura 11. Carcinoma de tipo escamoso (original). .....	68
Figura 12. Carcinoma <i>in situ</i> (original). .....	68
Figura 13. Adenoma de tipo túbulo-papilífero (original).....	69
Figura 14. Carcinoma de tipo cribiforme (original).....	74
Figura 15. Carcinoma de tipo túbulo-papilífero (original).....	75
<b>Figura 16.</b> Carcinoma de tipo mucinoso (original). .....	75
Figura 17. Carcinoma de tipo anaplásico (original). .....	76
Figura 18. Permeação vascular por células neoplásicas (original). .....	78
Figura 19. Carcinoma de grau III de malignidade (original).....	80
Figura 20. Metástase de carcinoma mamário num linfonodo (original). .....	81

## Índice de Tabelas

Tabela 1. Caracterização etária dos canídeos com tumores mamários. ....	51
Tabela 2. Distribuição da amostra populacional de canídeos em função do sexo.....	52
Tabela 3. Distribuição dos cães com tumores mamários consoante as raças puras.....	53
<b>Tabela 4.</b> Distribuição dos cães com tumores mamários consoante os tipos de raça.....	54
Tabela 5. Caracterização etária dos gatos com neoplasias mamárias.....	56
Tabela 6. Distribuição da amostra populacional de gatos em função do sexo.....	58
Tabela 7. Distribuição dos gatos com tumores mamários consoante as raças puras.....	59
Tabela 8. Distribuição dos gatos com tumores mamários consoante o tipo de raça. ....	59
Tabela 9. Caracterização etária dos canídeos com tumores mamários malignos e benignos. .....	61
Tabela 10. Caracterização etária dos gatos com tumores mamários malignos e benignos..	71

## Índice de Abreviaturas e de Símbolos

% - Percentagem

A.D.N. – Ácido desoxirribonucleico

AgNORs – Regiões Organizadoras Nucleolares Argirofílicas

ARN – Ácido Ribonucleico

cm<sup>3</sup> – centímetros cúbicos

COMT – Catecol-O-Metiltransferase

COX-2 – Ciclooxygenase-2

E.U.A. – Estados Unidos da América

E-caderina – Epitelial-caderina

EGF-R – Receptor do factor de crescimento epidérmico

FMV – Faculdade de Medicina Veterinária

GH – Growth hormone (Hormona de crescimento)

H&E – Hematoxilina e Eritrosina

HER-2 (ErbB2) – Receptor do factor de crescimento epidérmico humano tipo-2

IC (95%) – Intervalo de confiança (95%)

M – Metastização à distância (Sistema de classificação TNM)

MEC – Matriz extracelular

ml – Mililitro

N – Linfonodos regionais (Sistema de classificação TNM)

N= – Número de casos

ng – nanograma

OVH – Ovariohisterectomia

PAAF– Punção Aspirativa com Agulha Fina

P-caderina – Placental-caderina

PCNA – Proliferating Cell Nuclear Antigen (Antígeno do núcleo de células em proliferação)

PRL-R – Prolactine Receptor (Receptor de Prolactina)

PTEN – Phosphatase and Tensin homolog (Proteína homóloga da fosfatase e tensina)

RE – Receptor de estrogénio

RP – Receptor de progesterona

RP-A – Receptor de progesterona A (isoforma A do receptor de progesterona)

RP-B – Receptor de progesterona B (isoforma B do receptor de progesterona)

T – Tamanho da neoplasia primária (Sistema de classificação TNM)

TGF – Tumoral Growth Factor (Factor de crescimento tumoral)

TNM – Tumor-Nodo-Metástase (Sistema de classificação TNM)

ULTD – Unidades Lobulares Terminais Ductais

UTL – Universidade Técnica de Lisboa

VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor (Factor de crescimento do endotélio vascular)

## I. Introdução geral

O estágio, constituído por dois períodos, decorreu no tempo compreendido entre 1 de Outubro de 2009 e 30 de Setembro de 2010. No primeiro período desenvolvi actividades na área da Clínica de Animais de Companhia, ao passo que a segunda parte do estágio teve lugar no departamento de Sanidade Animal. O período de estágio efectuado na área da Clínica teve a duração de aproximadamente 5 meses e meio (1 de Outubro a 6 de Abril) e foi efectuado no Hospital Veterinário do Universidade de Córdoba (1 de Outubro a 31 de Dezembro) e posteriormente no Hospital da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa (FMV-UTL) (18 Janeiro a 5 Abril). A segunda etapa do estágio, que decorreu durante aproximadamente 7 meses (6 de Abril a 30 de Setembro), foi realizada na área de Anatomia Patológica da FMV-UTL. Embora a primeira parte do estágio fosse direccionada para a Clínica de Pequenos Animais, no Hospital de Córdoba também pude acompanhar e participar no trabalho realizado na área da Clínica e Cirurgia de Cavalos. Durante todo o meu estágio em Clínica tive a oportunidade de desenvolver actividades no âmbito da Medicina Interna, Imagiologia, Cirurgia e Internamento. Na área de Medicina Interna assisti a consultas de Medicina Geral e dos Novos Animais de Companhia e ainda a consultas de referência de Neurologia, Ortopedia, Oftalmologia, Dermatologia e Reprodução. Durante o tempo dispendido em Medicina Geral e sob supervisionamento médico, foi possível obter a história médica pregressa e realizar o exame físico relativamente aos cães e gatos e aos animais exóticos. No serviço de Imagiologia colaborei na execução e interpretação de vários exames de radiologia, ecografia e TAC. Para além da Medicina Interna, também desempenhei tarefas na área de Cirurgia. Como tal, pude participar na preparação pré-anestésica e indução e manutenção anestésicas dos pacientes, como instrumentista, no fornecimento do material de cirurgia e sua disposição na mesa de apoio e ainda, no auxílio do cirurgião durante a execução de variados procedimentos cirúrgicos. Também pude acompanhar os animais no período pós-operatório, na avaliação da evolução e cicatrização das suturas, aplicação de vários tipos de pensos e remoção de pontos. Em Córdoba, e sob supervisionamento, executei todos os procedimentos cirúrgicos e pós-cirúrgicos associados à realização duma OVH. No Hospital da FMV efectuei turnos com a duração de 12 ou 24 horas, durante os quais efectuava a monitorização e administração de medicação aos animais internados e prestava-lhes todos os cuidados básicos de alimentação e higiene. Para além destas actividades, no dia 17 de Dezembro de 2009, efectuei uma apresentação baseada no caso duma cadela submetida a uma mastectomia regional (cadeia mamária esquerda) e simples (cadeia mamária direita) no Hospital de Córdoba. Nos meses correspondentes ao estágio em Anatomia Patológica desempenhei várias actividades, entre as quais a realização de necrópsias, processamento

das amostras no laboratório (corte, colocação dos fragmentos nos respectivos blocos e sua posterior inclusão em parafina), coloração de lâminas com esfregaços citológicos e cortes histopatológicos e sua observação ao microscópio. Ao nível microscópico observei cortes histopatológicos de mama e também de pele e outros órgãos. Tive também a oportunidade de analisar esfregaços citológicos correspondentes a diversos processos patológicos. Para além disso, participei nas consultas realizadas no Hospital da FMV, direccionadas ao departamento de Anatomia Patológica, auxiliando na execução de punções aspirativas com agulha fina (PAAF) e biópsias de pele. Na presente dissertação foi efectuado um estudo epidemiológico, o qual teve como objectivo a caracterização da patologia presente nas glândulas mamárias e, no caso específico das neoplasias mamárias, a análise dos aspectos respeitantes à sua classificação histológica e metastização. O material de estudo consistiu nas amostras de glândulas mamárias de canídeos e felídeos domésticos, analisadas pelo Laboratório de Anatomia Patológica da FMV-UTL no período de tempo compreendido entre 1 de Janeiro de 2009 e 30 de Junho de 2010.

## II. Revisão bibliográfica

### 1. Introdução

O estudo dos tumores mamários na cadela e na gata tem adquirido cada vez maior importância, devido às semelhanças que apresentam com os que ocorrem na mulher e também pelo facto de aparecerem com muita frequência na prática clínica. O primeiro aspecto deve-se ao seu interesse em patologia comparada, cujos fundamentos decorrem da utilização de modelos animais adequados (Peleteiro, 1994). Muitos estudos baseiam-se na gata e principalmente na cadela como modelos para a mulher (MacEwen, 1990; Zappulli, De Zan, Cardazzo, Bargelloni, & Castagnaro, 2005). Apesar de haver uma maior comparação da espécie canina com a humana, maioritariamente devido ao facto de existirem mais estudos acerca dos tumores mamários em cães do que em gatos, sabe-se que a histologia respeitante às neoplasias das glândulas mamárias da gata encontra-se mais próxima da da mulher (Pérez-Alenza, Jiménez, Nieto, & Peña, 2004). No entanto, também os tumores mamários da espécie canina e humana partilham várias características epidemiológicas, morfológicas, clínico-patológicas e bioquímicas (Kumaraguruparan, Prathiba, & Nagini, 2006). Em termos de investigação na área da cancerologia, os tumores mamários representam um desafio, se tivermos em conta que se trata da neoplasia que maior diversidade morfológica pode apresentar, surgindo a partir duma população celular variada, que se encontra muitas vezes associada no mesmo tumor (Peleteiro, 1994). Para uma melhor compreensão dos aspectos patológicos relativos aos tumores mamários é apresentada, em seguida, uma breve descrição da anatomia e histologia normal da glândula mamária.

Na cadela e na gata as glândulas mamárias estão dispostas em duas cadeias bilaterais simétricas que se estendem desde o tórax ventral até à região inguinal, localizadas dum e de outro lado da linha branca. As cadelas têm cinco pares de glândulas mamárias, enquanto as gatas têm quatro pares. Na cadela tomam a seguinte designação, do sentido cranial para o caudal: primeiras ou craniais torácicas, segundas ou caudais torácicas, terceiras ou craniais abdominais, quartas ou caudais abdominais e quintas ou inguinais (Peleteiro, 1994; Patsikas et al., 2006). Na gata, as glândulas mamárias são denominadas, também no sentido antero-posterior, de torácicas ou primeiras, abdominais anteriores ou segundas, abdominais posteriores ou terceiras e inguinais ou quartas (Peleteiro, 1994). No entanto, para Raharison e Sautet (2006), esta denominação é a seguinte: primeira torácica (T1), segunda torácica (T2), primeira abdominal (A1) e segunda abdominal (A2).

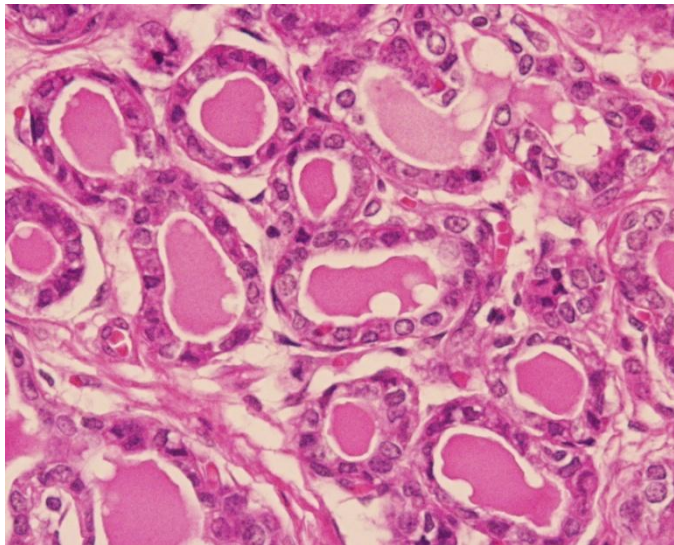
Em termos histológicos, as glândulas mamárias são glândulas compostas túbulo-alveolares apócrinas (Banks, 1993; Junqueira & Carneiro, 2004; Fossum, 2007), sendo consideradas glândulas sudoríferas modificadas (Banks, 1993). Elas são constituídas por lóbulos que contêm as ramificações correspondentes às unidades lobulares terminais ductais (ULTD), as quais terminam em pequenos ácinos dispostos em forma de cacho de uva. As ULTD são formadas por sucessivas ramificações dos grandes ductos (Robbins, 2005). Os lóbulos encontram-se separados entre si por septos de tecido conjuntivo denso e por tecido adiposo, drenando para um ducto excretor, o ducto interlobular (Banks, 1993; Peleteiro, 1994; Junqueira & Carneiro, 2004). Por sua vez, vários ductos interlobulares confluem para formar o ducto lobar (Banks, 1993) também denominado de lactífero (Peleteiro, 1994) ou galactóforo (Junqueira & Carneiro, 2004), que colecta toda a secreção dum lobo (Banks, 1993). Cada um destes últimos ductos abre directa e independentemente no mamilo, em número variável (Peleteiro, 1994; Junqueira & Carneiro, 2004). Na cadela o número de aberturas por mamilo está compreendido entre 8 e 20, ao passo que na gata encontra-se entre 4 e 7 (Banks, 1993). Antes da abertura dos ductos lactíferos no mamilo eles formam uma dilatação ampolar denominada de seio lactífero (Banks, 1993; Peleteiro, 1994) ou galactóforo (Junqueira & Carneiro, 2004). O epitélio de revestimento dos ductos lactíferos é formado por uma dupla camada de células epiteliais cúbicas ou cilíndricas baixas (Solano-Gallego, 2010; Banks, 1993; Peleteiro, 1994), ao passo que os ductos intralobulares são revestidos por um epitélio simples cúbico, embora as porções iniciais destes apresentem um epitélio simples cilíndrico (Banks, 1993; Peleteiro, 1994) (figura 1). As células que constituem o epitélio de revestimento dos ductos intralobulares são denominadas de células epiteliais luminais (Misdorp, Else, Hellmén & Lipscomb, 1999, WHO). A revestir os ductos interlobulares está um epitélio simples cilíndrico ou cúbico (Banks, 1993; Junqueira & Carneiro, 2004). Os ductos maiores e os menores são rodeados por fibras elásticas e músculo liso e por tecido conjuntivo reticular, respectivamente (Solano-Gallego, 2010).

A organização estrutural da mama varia consoante a maturidade sexual da fêmea, sendo diferente na fêmea impúbere e púbere, sofrendo também alterações aquando do período de gravidez e de lactação (Banks, 1993; Peleteiro, 1994; Junqueira & Carneiro, 2004) e durante as diferentes fases do ciclo éstrico (Rehm, Stanislaus & Williams, 2007). Assim sendo, a mama da fêmea impúbere é constituída por um sistema tubular ramificado rudimentar, ligado aos ductos lactíferos (Peleteiro, 1994). Aquando da puberdade, o aumento dos estrogénios provoca, a nível mamário, um maior crescimento e ramificação dos ductos lactíferos, para além duma acumulação de tecido adiposo e conjuntivo (Peleteiro, 1994; Junqueira & Carneiro, 2004), embora este último aspecto suceda de forma pouco marcada na cadela e na gata comparativamente ao que ocorre na mulher. Assim sendo, o volume externo das glândulas mamárias da espécie canina e felina aumenta apenas ligeiramente e

sobretudo no que diz respeito às mamas abdominais caudais e inguinais. Cada lóbulo encontra-se imerso por um estroma que envolve a zona mais proximal dos ductos, o qual é formado por tecido conjuntivo relativamente denso, ao passo que o estroma interlobular é constituído por tecido conjuntivo mais laxo (Peleteiro, 1994). Durante a gravidez, a acção da progesterona desencadeia a proliferação das células epiteliais da porção terminal dos ductos intralobulares, formando assim os alvéolos secretores (Peleteiro, 1994; Junqueira & Carneiro, 2004), os quais são revestidos por um epitélio simples cilíndrico. O componente secretor é então formado pelo epitélio alveolar e por parte das células epiteliais dos ductos intralobulares (Banks, 1993). Entre as células do epitélio de revestimento dos alvéolos e dos ductos intralobulares, interlobulares e lactíferos e as respectivas membranas basais estão presentes as células mioepiteliais, as quais contribuem, sob influência da oxitocina, para a expulsão do leite aquando da lactação (Peleteiro, 1994; Junqueira & Carneiro, 2004). A forma activa da oxitocina é libertada da neurohipófise para a circulação sanguínea, sendo o precursor desta hormona produzido no hipotálamo (Wathes & Swann, 1982; Ivell et al., 1995). Na cadela, a influência prolongada da progesterona não se verifica somente durante a gravidez mas também no decorrer do meta-estro. Este fenómeno deve-se ao facto da progesteronémia aumentar desde o fim do pro-estro atingindo valores de pico compreendidos entre 30 a 40 ng/ml, nos dias 10 e 25 do ciclo éstrico. Posteriormente há uma diminuição destes níveis até atingir um valor basal entre os dias 80 e 100, ou seja cerca de 3 meses após o início do aumento de progesterona no sangue (Coster, Bekers, Wouters-Ballman & Ectors, 1979; Peleteiro, 1994). Na cadela há também outras situações que levam ao aumento seguido de manutenção num patamar elevado dos níveis sanguíneos de progesterona, sendo elas a pseudogravidez, devido à permanência patológica do corpo lúteo, e a administração prolongada de anti-concepcionais à base de progestagénios (Peleteiro, 1994). Na fêmea lactante, o parênquima mamário encontra-se muito desenvolvido, ao contrário dos septos de tecido conjuntivo que sofrem atrofia (Peleteiro, 1994; Banks, 1993). Nem todas as células secretoras se encontram activas ao mesmo tempo (Banks, 1993) e, por isso, alguns ductos e alvéolos secretores aparecem distendidos com secreção lactogénea (figura 1), ao passo que outros apresentam-se quase vazios (Peleteiro, 1994). Anteriormente à secreção do leite, o colostro é secretado, o qual, entre outras funções, é responsável por conferir imunidade passiva ao recém-nascido (Banks, 1993; Solano-Gallego 2010; Junqueira & Carneiro, 2004). Sob influência hormonal, durante a gravidez e até à fase da lactação, a glândula mamária sofre hipertrofia e hiperplasia marcadas (Solano-Gallego, 2010). Após a lactação, a maioria dos alvéolos desenvolvidos durante a gravidez sofre processos de degenerescência e apoptose, sendo as células alveolares libertadas para o lúmen dos alvéolos e posteriormente fagocitadas por macrófagos (Junqueira & Carneiro, 2004). Na glândula mamária pós-lactacional diminui assim o parênquima mamário, assistindo-se então a uma diminuição do volume glandular e

a um aumento da espessura do tecido conjuntivo que constitui os septos interlobulares (Banks, 1993, Peleteiro, 1994). As hormonas directamente envolvidas na lactogénese são a prolactina, a somatomatotropina placentária e os glucocorticóides da supra-renal e, indirectamente, os estrogénios, a progesterona e a somatotropina (Peleteiro, 1994; Junqueira & Carneiro, 2004). Para além destas hormonas, está também presente a oxitocina, já mencionada anteriormente.

**Figura 1.** Glândula mamária normal (original).



Na figura é visível o epitélio simples cúbico dos ductos intralobulares, os quais contêm secreção no lúmen. As células epiteliais apresentam-se bem diferenciadas, com uma relação núcleo/citoplasma normal e com o núcleo em posição basal. Canídeo, Labrador, 9 anos, F. 400X, H&E.

## 2. Dados epidemiológicos

### 2.1. Cão

#### 2.1.1. Frequência relativa e absoluta

As neoplasias mamárias são o segundo processo neoplásico mais comum na espécie canina, sendo que o primeiro consiste nos tumores da pele (Dobson & Morris, 2001; Solano-Gallego, 2010). No entanto, se considerarmos apenas o sexo feminino, os tumores mamários são considerados os mais frequentes, em relação a outra patologia tumoral (Kitchell & Loar, 1997; Morrison, 1998; Misdorp, 2002). Segundo Thuróczy et al. (2007), estas neoplasias correspondem a 52% do total de tumores encontrados em canídeos domésticos. Madewell e Theilen (1987) e Millanta, Calandrella, Citi, Della Santa e Poli (2005) descreveram-nas como representando 25%-50% do total de neoplasias nesta espécie. A taxa de incidência anual foi estimada em 198/100.000, sendo três vezes maior que na espécie humana (Misdorp, 2002). Numa amostra de 80 000 cadelas, analisada na Suécia, a taxa calculada foi de 111 animais com tumores mamários por cada 10 000 casos (Egenvall et al., 2005).

#### 2.1.2. Idade

A incidência de neoplasias mamárias aumentou na última década (Thuróczy et al., 2007). Como o risco de desenvolvimento tumoral aumenta com a idade, um dos factores explicativos desta maior incidência encontrada é o aumento da esperança média de vida dos animais domésticos (Thuróczy et al., 2007). Rutteman, Withrow e MacEwen (2001) afirmaram que a idade média em que se verifica a ocorrência de tumores mamários encontra-se entre os 10 e os 11 anos, sendo rara nos cães com menos de 4 anos, embora segundo Madewell e Theilen (1987) e Millanta et al. (2005) esta idade esteja localizada entre os 6 e os 10 anos. Num estudo realizado na Califórnia em 201 cadelas, a média de idades dos animais que apresentavam tumores mamários benignos e malignos era de 10 e 11 anos, respectivamente (Fowler, Wilson & Koestner, 1974). Taylor, Shabestari e Williams (1976), numa análise efectuada em cães da raça Beagle, verificaram que a partir dos 14 anos de idade a taxa de incidência de neoplasias mamárias benignas começava a diminuir, ao passo que nas neoplasias malignas esta taxa continuava a aumentar. Estes achados sugerem que, à medida que a idade da população canina aumenta, podemos esperar encontrar uma maior frequência de tumores mamários e possivelmente uma incidência mais elevada de tumores malignos relativamente aos benignos (Brodey, Goldschmidt & Roszel, 1983).

### 2.1.3. Sexo

A presença destas neoplasias no macho é muito pouco frequente e, no caso de estarem presentes, algumas delas encontram-se associadas a alterações hormonais, tais como as relacionadas com Sertolinomas (Misdorp, 2002). O risco de desenvolvimento destes tumores em machos é cerca de 1% ou menos do verificado em fêmeas (Rutteman et al., 2001). Num estudo retrospectivo, foi descrito como sendo sessenta e duas vezes mais provável uma cadela desenvolver tumores mamários, comparativamente ao cão (Saba, Rogers, Newman, Mauldin & Vail, 2007). Ainda segundo Saba et al. (2007), estes tumores são considerados maioritariamente benignos, aquando da sua apresentação no sexo masculino. Tal facto é contrariado por diversos autores, como por exemplo Jabara (1969); Brodey et al. (1983); Viadel, Borràs e Morales (2005), que os descrevem como sendo normalmente malignos.

### 2.1.4. Raça

Não tem sido possível estabelecer uma predisposição rácica para as neoplasias mamárias (Peleteiro, 1994), embora se tenha verificado uma maior apresentação destas neoplasias em várias raças Spaniel e, em alguns estudos, também no Caniche e Dachshund (Rutteman et al., 2001). Outros autores apontam para uma maior incidência no Caniche, Spaniel inglês, Setter inglês, Pointer, Cocker Spaniel, Fox Terrier e Terrier de Boston (Cohen, Reif, Brodey & Keiser, 1974; Mitchell, De la Iglesia & Wenkoff, 1974; Rutteman et al., 2001). Ao contrário do que sucede com as neoplasias em geral, os Boxers parecem ser menos susceptíveis no caso dos tumores mamários, embora se tenha verificado que nesta raça surgem numa idade mais jovem, comparativamente aos animais de outras raças (Brodey et al., 1983; Peleteiro, 1994).

### 2.1.5. Tumores benignos versus malignos

Segundo Rutteman et al. (2001), 50% dos tumores mamários da espécie canina são malignos. No entanto, a incidência da forma maligna é bastante variável, podendo encontrar-se entre os 34% (Rostami et al., 1994, citado por ITOH et al., 2005) e os 93% (Hashimoto, Yamura, Sato, Kanayama & Sakai, 2002). Num estudo efectuado por Peleteiro, Branco e Correia (1996), a frequência relativa de neoplasias malignas correspondia a 85,6%. Relativamente ao rácio tumor benigno/maligno, este parâmetro é difícil de determinar, pelos seguintes motivos: os tumores benignos nem sempre são alvo de atenção por parte do clínico veterinário ou, no caso de o serem, por vezes não são submetidos a

extirpação cirúrgica e posteriormente enviados para análise histopatológica (Misdorp, 2002, Brodey et al., 1983, Peleteiro, 1994). É importante ter em conta que, dentro dos tumores malignos, verifica-se uma predominância dos carcinomas (Morrison, 1998; Misdorp, 2002).

#### 2.1.6. Hormonas

Um dos factores que diminui o risco de desenvolvimento de tumores mamários é a realização de ovariectomia, sendo esta comum nos E.U.A. mas ainda não tão frequente nos países europeus (Rutteman et al., 2001). Sabe-se que a incidência de tumores mamários malignos nas cadelas esterilizadas antes do primeiro cio é de 0.05%, sofrendo um aumento para 8% e 26% se a ovariectomia for realizada entre o primeiro e o segundo cios e depois do segundo cio, respectivamente (Rutteman et al., 2001). Quando este procedimento é efectuado em idades mais avançadas, parece reduzir a incidência de tumores mamários benignos, ao passo que, no que diz respeito aos tumores malignos, não se verifica uma redução (Rutteman et al., 2001; Misdorp, 2002). Ao contrário da ovariectomia, a administração de progestinas injectáveis para controlar o ciclo éstrico é responsável por um aumento da incidência destas neoplasias (Rutteman et al., 2001). Owen e Briggs (1976) observaram uma maior frequência de tumores mistos benignos em cadelas submetidas a níveis elevados de progestagénios.

#### 2.1.7. Localização

No que diz respeito à localização, sabe-se que a incidência de tumores e displasias aumenta quanto mais caudal for a glândula mamária (Misdorp, 2002). Assim sendo, é nas mamas caudais abdominais e inguinais onde se detectam, com maior frequência, os tumores mamários (Brodey et al., 1983; Peleteiro, 1994; Peleteiro et al., 1996). Cerca de 66% destas neoplasias localizam-se nestas glândulas, possivelmente por serem as que contêm maior quantidade de parênquima mamário (Rutteman et al., 2001). É comum haver mais de uma glândula mamária atingida, podendo mesmo toda a cadeia mamária do mesmo lado encontrar-se afectada, sendo ainda possível verificar a existência de mais de uma massa tumoral na mesma glândula. Quando tal acontece, as neoplasias mamárias são consideradas multicêntricas (Peleteiro, 1994). Brodey et al. (1983) afirmaram que este tipo de tumores encontra-se presente em pelo menos metade do total de pacientes observados. Também Misdorp (2002) afirmou que a presença de múltiplos tumores, a maioria de diferentes tipos histológicos, é frequente na espécie canina. Ao avaliar a possibilidade de origem multicêntrica dum tumor mamário é necessário ter em consideração a circulação

linfática, visto haver casos de multiplicidade primária propriamente dita e outros de extensão do processo às glândulas envolvidas na mesma rede linfática (Misdorp, 2002; Peleteiro, 1994).

#### 2.1.8. Outros factores analisados

Ao contrário do verificado na mulher, não se encontrou nenhuma relação entre a gravidez em idades mais prematuras e a diminuição do risco de desenvolvimento tumoral (Rutteman et al., 2001). Também não foi encontrada nenhuma associação entre as irregularidades do ciclo éstrico e o aparecimento de neoplasias e não há consenso, entre os diferentes autores, no que diz respeito ao efeito da lactação durante a pseudogestação no despoletar destes tumores (Misdorp, 2002).

## 2.2. Gato

### 2.2.1. Frequência relativa e frequência absoluta

Na espécie felina, os tumores mamários ocupam o terceiro lugar em frequência, sendo menos comuns que os linfomas e os tumores da pele (Misdorp, 2002). A frequência relativa do total de neoplasias mamárias na espécie felina e especificamente na gata foi estimada em cerca de 12% e 17%, respectivamente (Misdorp, 2002). Carpenter, Andrews e Holtzworth (1987) verificaram que estes tumores correspondiam a 10% do total de tumores não linfóides. A taxa de incidência anual destas neoplasias foi estimada em 12,8/100 000 animais, subindo para 25,4/100 000 se considerarmos uma população em situação de risco (Dorn, Taylor, Frye & Hibbard, 1968; Peleteiro, 1994; Misdorp, 2002). No entanto, os dados sobre estes tumores são, em regra, pouco seguros, visto ser difícil caracterizar o conjunto da população felina em estudo (Peleteiro, 1994).

### 2.2.2. Idade

A idade média à primeira detecção de tumores mamários encontra-se entre os 10 e os 11 anos, estando o intervalo de idades compreendido entre 2,5 e 13 anos (Misdorp, 2002). Segundo Carpenter et al. (1987), a média de idades a que surgem estes tumores é de 10 anos. Peleteiro (1994) afirma que a idade média de desenvolvimento de tumores mamários na gata varia, segundo os autores, entre os 10,7 e 12,6 anos. Em gatos machos a idade média relatada ao diagnóstico de neoplasia mamária é ligeiramente mais tardia que a das

fêmeas, correspondendo a 12,8 anos (Skorupski et al., 2005). Há a considerar o facto de algumas displasias mamárias, como é o caso da lesão fibroadenomatosa mamária felina (Misdorp et al., 1999, WHO), poderem ocorrer antes do primeiro ano de idade. Segundo Hayden, Barnes e Johnson (1989), Misdorp et al. (1999), WHO e Loretto, Da Silva Ilha, Ordás e De las Mulas (2005) considera-se que esta displasia surge essencialmente em gatas jovens e inteiras, na altura da puberdade ou durante o primeiro ciclo éstrico, podendo também ocorrer aquando da pseudogestação ou gestação. Tendo em conta o referido a propósito da idade e da taxa de incidência de tumores mamários, pode concluir-se que as neoplasias mamárias são menos frequentes e aparecem a uma idade um pouco mais tardia na espécie felina, comparativamente com a canina (Peleteiro, 1994).

### 2.2.3. Sexo

Nos gatos machos os tumores mamários ocorrem raramente, estando os poucos casos observados reportados a animais castrados (Cotard, 1975; Raharison & Sautet, 2006). Sendo assim, tal como nas cadelas, estes tumores são um problema praticamente exclusivo do sexo feminino (Misdorp, 2002).

### 2.2.4. Raça

Alguns autores afirmam ser os felinos da raça siamesa os mais afectados (Rutteman et al., 2001), podendo o risco de desenvolvimento de tumores mamários ser duas vezes maior nesta raça que nas outras (Rutteman et al., 2001). No entanto, considerando que a proporção entre as diferentes raças existentes numa dada população de gatos é no geral mal conhecida, parece ser demasiado arriscado afirmar que existe predisposição rácica deste ou daquele grupo em especial (Peleteiro, 1994).

### 2.2.5. Tumores benignos versus malignos

Segundo Hayes e Mooney (1985), o rácio tumores malignos/benignos foi estimado em 9:1, ao passo que Misdorp, Romijn e Hart (1991) obtiveram um rácio de 4:1. Cotard (1975) referiu que, num total de 105 gatas com neoplasias mamárias, a frequência relativa de tumores benignos era de 5,7%, enquanto no caso dos tumores malignos esta percentagem correspondia a 94,3%. Uma comparação entre a espécie felina e canina, permitiu reforçar a ideia de que a quantidade de tumores malignos é mais elevada no gato (86%) que no cão (42%) (Hahn & Adams, 1997; Pérez-Alenza, Jiménez, Nieto & Peña, 2004). Rutteman et al.

(2001) afirmaram que a maioria das neoplasias mamárias na espécie felina, especialmente em animais mais velhos, são malignas e agressivas. Os tipos mais frequentes de tumores malignos incluem os carcinomas, sarcomas e tumores mistos malignos (Lombard, 1940; Nielsen, 1952 citados por Raharison & Sautet, 2006).

#### 2.2.6. Hormonas

Nas gatas, a castração também parece inibir o desenvolvimento das neoplasias mamárias, havendo mesmo autores que referem que o risco de aparecimento de tumores da mama é 7 vezes maior nas fêmeas inteiras que nas castradas (Brodey, 1970). Posteriormente, Rutteman et al. (2001) relataram que as gatas ovariectomizadas têm um risco de desenvolver tumores mamários 40 a 60% inferior ao de gatas inteiras. Mais recentemente, Fossum (2007) descreve que em gatas ovariectomizadas antes dos 6 meses de idade, o risco de desenvolvimento de carcinomas mamários é de 9% aumentando para 14% em gatas sujeitas a tal procedimento entre os 6 e os 12 meses de idade. Millanta et al. (2005) afirmam que as hormonas ováricas desempenham um papel chave no desenvolvimento dos tumores mamários, sendo tal facto suportado pelos efeitos protectores da ovariectomia e pela ocorrência esporádica de lesões mamárias displásicas e neoplásicas em gatas tratadas com progestagénios. Um exemplo destas lesões displásicas é a lesão fibroadenomatosa mamária felina, a qual se encontra associada ao efeito da progesterona endógena e/ou exógena (Hayden et al., 1989; Misdorp et al., 1999, WHO). No entanto, os estudos hormonais realizados no gato são em menor número dos que se dedicam ao cão (Peleteiro, 1994).

#### 2.2.7. Localização

Nas gatas, as mamas torácicas são as mais afectadas. O tumor pode tomar características de multicêntrico, atingindo por vezes toda a cadeia mamária do mesmo lado (Cotard, 1975; Peleteiro, 1994). Também Misdorp (2002) afirmou que é relativamente comum a existência de múltiplos tumores mamários na espécie felina, tanto de diferentes tipos histológicos como do mesmo tipo.

### 3. Etiologia

#### 3.1. Factores hormonais e respectivos receptores

##### 3.1.1. Cão

Os factores hormonais mais comumente implicados na génese tumoral são os estrogénios, a progesterona, os androgénios, a prolactina e a hormona de crescimento. Seguidamente é feita uma breve descrição sobre a influência destas hormonas nos tumores mamários.

Verificou-se que a progesterona e os estrogénios desempenham um papel crucial no controlo do crescimento e desenvolvimento das glândulas mamárias sendo também, como tal, factores de risco no despoletar das neoplasias mamárias. A exposição prolongada a progesterona (devido ao tratamento com derivados exógenos desta hormona ou ao efeito prolongado da progesterona endógena durante a fase lútea) estimula a proliferação do epitélio mamário (Thuróczy et al., 2007). No que diz respeito aos estrogénios, uma das acções desempenhadas por estas hormonas, que contribui para o crescimento das neoplasias mamárias, consiste no estímulo à produção do factor de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (Dabrosin, Margetts & Gauldie, 2003; Illera et al., 2006). A influência destas hormonas na carcinogénese é a razão porque os tumores mamários ocorrem quase exclusivamente em fêmeas e de alguns dos que se desenvolvem em machos estarem associados a tumores testiculares produtores de estrogénios (Sertolinomas) (Misdorp, 2002). Num estudo efectuado por Thuróczy et al. (2007) foi sugerido que a maior parte dos receptores de progesterona presentes nos tumores mamários do cão apresentam-se na forma não ligada. Na medida em que os receptores das hormonas esteróides podem ser activados através dum mecanismo dependente dum ligando, na ausência de ligação estes permanecem associados a um complexo transcricionalmente inactivo, o qual se encontra localizado no citoplasma. Aquando da ligação, os receptores são libertados do complexo e translocados para o núcleo (Thuróczy et al., 2007).

A dependência hormonal dos tumores mamários da espécie canina foi primeiramente evidenciada por Schneider, Dorn e Taylor (1969), quando demonstraram que as cadelas ovariectomizadas antes do primeiro ciclo éstrico apresentavam um menor risco de desenvolvimento de tumores mamários, em comparação com as submetidas ao mesmo procedimento cirúrgico antes dos dois anos de idade.

Num estudo efectuado por Donnay, Wouters-Ballman, Devleeschouwer, Leclerc e Vertegen (1995b) foi demonstrado que 95% das glândulas mamárias normais, dum grupo de cadelas

analisado, continham receptores de progesterona e/ou estrogénios. No que diz respeito aos tumores mamários e ainda considerando a espécie canina, esta percentagem correspondia a 50% (MacEwen, Patnaik, Harvey & Panko, 1982). Segundo Misdorp (2002), verificou-se que 40-60% dos tumores benignos e malignos apresentavam positividade para a presença de receptores de progesterona (RPs), receptores de estrogénios (REs) e receptores de prolactina (PRL-Rs). Analisando a dependência hormonal e a taxa de proliferação celular verificou-se que a primeira diminui e a segunda aumenta, à medida que os tumores mamários da espécie canina progridem no sentido duma maior malignidade histológica (Thuróczy et al., 2007). Assim sendo, é fácil concluir que os carcinomas mamários com um baixo grau de diferenciação apresentam um menor número de receptores hormonais, quando comparados com os mais diferenciados (Misdorp, 2002). Considerando a classificação histológica dos carcinomas em complexos e simples, verifica-se que os complexos têm maiores concentrações de receptores de estrogénios e progesterona comparativamente aos simples (Misdorp, 2002; Thuróczy et al., 2007). Assim sendo, na medida em que as concentrações de progesterona no citoplasma das células dos tumores benignos são significativamente maiores que o observado, a nível celular, nas neoplasias malignas, a presença desta hormona tem sido sugerida como estando associada a um mecanismo de auto-reparação celular (Thuróczy et al., 2007). A relação entre receptores de progesterona e de estrogénios deve-se ao facto da produção dos primeiros ser dependente do bom funcionamento da via estrogénio-receptor de estrogénio (De las Mulas et al., 2002).

Tendo em conta o papel que os receptores de progesterona desempenham no desenvolvimento neoplásico, torna-se importante ter em atenção alguns aspectos respeitantes à caracterização molecular dos mesmos. Como tal, foram encontradas duas isoformas do RP, as quais se denominam de RP-A e RP-B. Estes dois tipos de receptores são distintos funcionalmente e em termos dos seus genes alvo. Assim sendo, o RP-B é um activador de genes mais forte que o RP-A. Este último actua essencialmente como um repressor dominante do gene codificador do RP-B (Lantinga-van Leeuwen, van Garderen, Rutteman & Mol, 2000).

Atendendo ao complexo estrogénio-receptor de estrogénio, verifica-se que este é responsável pela indução de alterações genéticas e epigenéticas, que influenciam a expressão dum determinado número de genes envolvidos na regulação da proliferação e diferenciação celulares (Murphy & Watson, 2002; Shaw et al., 2002; Kumaraguruparan, Prathiba & Nagini, 2006). Num estudo realizado por Linjawi, Kontogiannea, Halwani, Edwardes e Meterissian (2004) foi observado um aumento da expressão da proteína anti-apoptótica (Bcl-2) em 73% dos tumores mamários positivos para REs, o que é indicativo da existência duma relação entre estas neoplasias e a evasão à apoptose. A nível molecular, foram identificadas duas isoformas do RE, sendo elas o RE- $\alpha$  e RE- $\beta$ . Numa análise

imunohistoquímica foi verificada a existência de REs- $\beta$  no núcleo de numerosas células epiteliais acinares e ductais, na glândula mamária normal e em 1/3 dos tumores mamários. No tecido mamário normal, todas as células do estroma e a grande maioria das células mioepiteliais eram negativas para REs- $\beta$ . No caso das neoplasias mamárias, as células mesenquimatosas dos sarcomas e as de tipo mioepitelial dos tumores complexos, também se encontravam desprovidas de tais receptores (De las Mulas et al., 2004). Quanto aos REs- $\alpha$ , a sua marcação imunohistoquímica foi observada em células epiteliais e mioepiteliais do tecido mamário normal e de tumores mamários benignos e malignos, ao passo que as células do estroma normais e neoplásicas bem como os osteócitos e condrócitos de tumores mistos eram REs- $\alpha$  negativos (Nieto et al., 2000). Comparando os dois tipos de receptores, verificou-se que a expressão de REs- $\beta$  era inferior à dos REs- $\alpha$ , na medida em que os REs- $\beta$  foram encontrados em 26% das neoplasias mamárias malignas, enquanto os outros receptores estavam presentes numa percentagem de tumores compreendida entre 37% e 70%, em estudos de radioimunoensaio, e entre 10% e 87,5%, em análises imunohistoquímicas. Estas duas isoformas parecem ter diferentes especificidades de ligação ao ligando. Os resultados de estudos experimentais indicam que uma das funções dos REs- $\beta$  consiste em modular a actividade transcricional dos REs- $\alpha$  (De las Mulas et al., 2004).

No que diz respeito aos androgénios, que também contribuem para o crescimento tumoral, sabe-se que estas hormonas podem ser produzidas nas glândulas mamárias normais e neoplásicas, tal como sucede com os estrogénios. Tal facto leva alguns autores a considerarem o tecido mamário como um tecido endócrino (Illera et al., 2006).

Quanto à hormona de crescimento (GH) e prolactina (PRL), alguns estudos demonstram a existência duma associação entre os desequilíbrios nos níveis destas hormonas e a carcinogénese, ao passo que outros defendem não haver qualquer relação entre estes dois aspectos (Misdorp, 2002).

No que diz respeito à GH, sabe-se que esta hormona actua de forma autócrina e parácrina como um factor de crescimento local, contribuindo para a proliferação e diferenciação das glândulas mamárias durante a fase lútea do ciclo éstrico e na altura da gravidez. O aumento da multiplicação celular desencadeada por esta hormona pode ser responsável por uma maior susceptibilidade mamária à transformação neoplásica (Lantinga-van Leeuwen et al., 2000). Em termos de localização, verifica-se um predomínio da GH em zonas focais de epitélio ductal hiperplásico (Misdorp, 2002). Um estudo imunohistoquímico realizado por Lantinga-van Leeuwen et al. (2000) demonstrou haver co-localização de RPs e GH nas amostras tecidulares de glândula mamária normal, indicando que a existência de RPs é um pré-requisito para a expressão do gene que codifica para a GH. Os mesmos autores afirmaram que os RPs podem estimular a expressão de GH de forma indirecta, fazendo com

que o promotor do gene GH se torne disponível para a ligação com outros factores de transcrição, e directa, activando este promotor. Também no referido estudo constatou-se que embora todas as células positivas para GH expressassem RPs, nem sempre o inverso se verificava. Para além disso, observou-se a ausência de marcação para RPs em alguns tumores GH positivos, uma vez que em estados mais avançados de doença neoplásica a expressão do gene que codifica para estes receptores pode perder-se. Tal facto indica o envolvimento de factores adicionais no controlo da expressão de GH (Lantinga-van Leeuwen et al., 2000).

Tendo em conta a prolactina, um estudo efectuado por Queiroga et al. (2005) demonstrou haver, ao nível dos tecidos tumorais mamários, uma correlação positiva e forte entre os níveis desta hormona e os das hormonas esteróides. Os resultados obtidos por estes autores parecem indicar que a maior parte da PRL detectada não é de origem hipofisária. Assim sendo, é provável que esta hormona seja, em parte, produzida localmente pelas células que sofreram transformação neoplásica, actuando de forma autócrina e parácrina. Também segundo Queiroga et al. (2005), o tamanho e a taxa de crescimento tumorais encontram-se positivamente relacionados com os níveis tecidulares de prolactina e das hormonas esteróides, o que permite concluir que estes compostos estimulam a proliferação celular, principalmente no que diz respeito aos tumores mamários malignos (Queiroga et al., 2005).

### 3.1.2. Gato e algumas comparações entre o gato e o cão.

Num estudo realizado por De las Mulas et al. (2002), um dos resultados obtidos consistiu no facto de metade dos tumores malignos positivos para RPs não expressar REs, sendo que a generalidade dos tumores dependentes da acção hormonal apresentava positividade para ambos os receptores ou apenas para os receptores de progesterona. Já em estudos anteriores, Hamilton, Else e Forshaw (1976) e Johnston, Hayden, Kiang, Handschin e Johnston (1984) tinham observado que a maioria dos carcinomas mamários felinos analisados era REs-negativo e RPs-positivo. Numa análise imunohistoquímica efectuada por Millanta et al. (2005), em amostras de tecido mamário de 68 gatas e 47 cadelas, foi demonstrada a existência duma menor expressão de REs nos carcinomas invasivos das gatas. Tais factos são indicativos da falta de dependência que os tumores mamários da espécie felina apresentam face à acção dos estrogénios, o que pode também explicar, em parte, o facto das neoplasias mamárias na gata apresentarem, no geral, uma maior agressividade quando comparadas com as das cadelas.

No que diz respeito à espécie canina, Millanta et al. (2005) verificaram que praticamente todos os tecidos mamários normais continham REs bem como RPs e que a expressão dos primeiros permanecia alta nas displasias e nos tumores benignos, com significativa diminuição nas neoplasias malignas. No entanto, uma considerável percentagem de carcinomas invasivos era REs-positivo. Tais achados mostram uma maior dependência hormonal dos tumores mamários da cadela, em comparação com os da gata (Millanta et al., 2005). Tendo em conta a expressão dos RPs e ainda no referido estudo verificou-se que esta diminuía progressivamente desde as lesões hiperplásicas/displásicas, tumores benignos, até aos tumores malignos. Todavia, nas gatas foi verificado o cenário oposto, na medida em que a presença destes receptores aumentava no sentido das neoplasias, atingindo o seu máximo nos carcinomas *in situ*. Nos carcinomas invasivos foi observada uma diminuição dos RPs, embora 63,4% destes ainda apresentasse positividade para tais receptores. Esta percentagem era superior à verificada por De las Mulas et al. (2002), a qual correspondia a 38,5%.

Como referido anteriormente, uma das alterações frequentemente observadas nas glândulas mamárias de gatas muito jovens sujeitas à influência prolongada da progesterona exógena ou endógena, é denominada de lesão fibroadenomatosa mamária felina (Misdorp et al., 1999, WHO). Num estudo efectuado por Ordás, Millán, De los Monteros, Reymundo e De las Mulas (2004), foi analisada a expressão imunohistoquímica dos RPs, da GH e do factor de crescimento insulínico (IGF-I), em 22 amostras com este tipo lesional, tendo-se verificado que, em todos os casos, os RPs e a GH apresentavam-se co-localizados no compartimento epitelial. Tais resultados apontam para uma estimulação da produção de GH por intermédio da ligação da progesterona ao seu receptor, tal como sucede na cadela. Também foi observado o facto de 17 das 22 amostras expressarem adicionalmente IGF-I. Estes achados vão ao encontro do já descrito por outros autores para o cão e para o gato (Mol et al., 1995a; van Garderen et al., 1997), em como a GH produzida localmente sob influência da progesterona pode exercer, não só directamente mas também de forma indirecta, a sua acção estimuladora da proliferação celular, levando à produção autócrina/parácrina de outros factores de crescimento, como é o caso do IGF-I. Ainda no estudo realizado por Ordás et al. (2004) foi detectada, em algumas das amostras analisadas, a presença de RPs e GH nas células mioepiteliais e do estroma. Tais resultados contradizem os encontrados na espécie canina (van Garderen et al., 1997; Lantinga-van Leeuwen et al., 2000), embora van Garderen et al. (1999) tenham detectado a existência de receptores de GH nestes tipos celulares, em glândulas mamárias de cães.

Têm sido efectuados estudos com o objectivo de avaliar a relação entre a administração de progestinas sintéticas e a ocorrência de tumores mamários, na espécie canina e felina. No que diz respeito aos canídeos, foi verificado que o tratamento, a longo prazo, com estes

compostos aumenta ligeiramente o risco de desenvolvimento de tumores mamários benignos e de hiperplasia mamária, não tendo qualquer influência no despoletar de neoplasias malignas. O surgimento destas últimas pode ser estimulado pelo tratamento combinado de progestinas e estrogénios ou aquando da utilização de altas doses das primeiras, sendo que possivelmente o fornecimento de baixas doses encontra-se associado a algum grau de protecção face à transformação neoplásica (Misdorp, 2002). Nos gatos a administração regular destas hormonas sintéticas foi descrita como estando relacionada com um aumento significativo do risco de ocorrência de neoplasias mamárias, tanto malignas como benignas. No entanto, se o tratamento for realizado de forma irregular, não se verifica qualquer influência deste no desenvolvimento de tumores (Misdorp, 2002).

Tendo em conta a administração de estrogénios sintéticos, como o dietilestilbestrol, está descrito na espécie canina que, se esta ocorrer isoladamente durante um período de tempo prolongado, a incidência de tumores mamários não se encontra aumentada (Misdorp, 2002).

### **3.2. Factores genéticos**

As neoplasias podem desenvolver-se como consequência de alterações no ADN das células, que levam a um aumento, diminuição ou ausência de expressão de proteínas normais ou mesmo à produção de proteínas anormais. Assim sendo, determinadas proteínas supressoras tumorais, como é o caso da codificada pelo gene p53, deixam de ser expressadas ou são-no numa forma inactiva. Contrariamente, verifica-se a sobre-expressão de oncogenes codificadores de proteínas, manifestando-se estas numa forma constitucionalmente activa. Os tumores encontram-se associados a uma acumulação progressiva de anomalias genéticas e epigenéticas, as quais levam a alterações no crescimento, na apoptose e diferenciação celulares, nos mecanismos de reparação do ADN e noutras vias celulares críticas. Alguns sistemas modelo demonstram a existência duma progressão ordenada desde o estado de lesão pré-maligna até ao de tumor maligno e, dentro deste, desde o momento em que não apresenta características de neoplasia invasiva até ao surgimento de metástases. À medida que os tumores evoluem, assiste-se à diminuição da capacidade de reparação do ADN e a um aumento da instabilidade genómica. Estes eventos aceleram a acumulação de alterações genéticas nas células neoplásicas (Kusewitt & Rush, 2007).

No que diz respeito à instabilidade cromossómica, verificou-se a existência de anomalias no cariótipo celular associadas a esta. Entre elas, destaca-se a modificação no número (aneuploidia) e na configuração e morfologia dos cromossomas. Em tumores com notável instabilidade cromossómica, cada célula neoplásica pode ter um cariótipo diferente e exibir

um conjunto de deleções, translocações recíprocas e não recíprocas, mutações e amplificações. Quanto à aneuploidia, esta parece ser mais frequente nos tumores mamários da espécie canina, sendo significativamente mais comum nos malignos (62%) comparativamente aos benignos. Análises efectuadas evidenciaram o facto de não haver diferenças significativas entre neoplasias mamárias primárias e secundárias quanto à ploidia do ADN. Não foi ainda encontrada qualquer relação entre a presença de aneuploidia e os seguintes factores: tipo histológico tumoral, grau de malignidade nuclear, tamanho do tumor, ocorrência de metástases nos linfonodos e expressão de receptores de hormonas esteróides. No entanto, existe uma associação entre a fracção de células em fase S e a ocorrência de aneuploidia, sendo esta fracção maior nos tumores malignos e/ou aneuploides em comparação com os benignos e/ou diploides (Misdorp, 2002). Não é de mais recordar que a fase S é uma das fases do ciclo celular, sendo este constituído pelas fases G1 (pré-sintética), S (síntese do ADN), G2 (pré-mitótica) e M (mitótica). Há ainda um estádio fisiológico denominado de G0, do qual fazem parte as células quiescentes (Kusewitt & Rush, 2007). Esta alteração no número de cromossomas também se pode encontrar nos carcinomas mamários da espécie felina, sendo a hipodiploidia relativamente frequente. Nas gatas, nenhuma correlação foi demonstrada entre a aneuploidia e o tipo histológico tumoral, a permeação vascular, o tamanho tumoral e o grau de malignidade histológica (Misdorp, 2002).

Até aqui foram apenas descritos os principais tipos de alterações genéticas passíveis de ocorrer nas células neoplásicas. Considerando os mecanismos epigenéticos, estes referem-se a alterações na expressão de determinados genes, que ocorrem nas células somáticas, resultantes de acontecimentos que não envolvem modificações na sequência do ADN. Como tipos de mecanismos epigenéticos tem-se a metilação do ADN, o «imprinting» e a modificação das histonas. A metilação do ADN é essencial para a regulação da expressão genética nas células normais, sendo a hipometilação, particularmente a que ocorre a nível dos promotores, responsável pela activação de genes, ao passo que a hipermetilação leva ao silenciamento dos mesmos. As células tumorais são caracterizadas por uma hipometilação global do seu genoma, embora se possa verificar um aumento da metilação em determinados locais dos promotores e/ou do exão 1 dos genes (Kusewitt & Rush, 2007).

Como já foi referido anteriormente, na carcinogénese são de extrema importância as alterações do ADN que levam à diminuição e aumento da expressão de genes supressores tumorais e de oncogenes, respectivamente. Tendo em conta os genes supressores, verificou-se que estes englobam um grande número de diferentes genes relacionados com as neoplasias e que, quando inactivados através de mecanismos genéticos e/ou epigenéticos, levam à proliferação descontrolada das células tumorais e conseqüentemente ao crescimento tumoral. Estes genes podem ter como objecto o controlo dos mecanismos

de reparação do ADN, da apoptose, do ciclo celular e de outras vias celulares fundamentais. O seu silenciamento pode ocorrer por intermédio dos mecanismos anteriormente referidos, destacando-se a hipermetilação do ADN; a deleção do alelo que contém o gene supressor tumoral ou do segmento cromossómico ou mesmo do cromossoma inteiro onde o alelo reside; a mutação pontual e, por último, a recombinação mitótica, em que o alelo normal é substituído por um alelo mutante. No entanto, pensava-se que ambos os alelos dum gene teriam de sofrer mutação, como primeiramente afirmado por Alfred Knudson (1971), ou outro método de inactivação para que a neoplasia se pudesse desenvolver. Um exemplo disto é o das neoplasias com componente genética hereditária, em que todas as células do corpo herdaram uma mutação num dos alelos, podendo o alelo restante sofrer mutação somática. Contudo, estudos recentes sugerem que para determinados genes supressores a inactivação em apenas um dos alelos é suficiente para haver crescimento tumoral (haploinsuficiência) (Kusewitt & Rush, 2007).

Um dos genes supressores tumorais mais estudados é o p53. A sua inactivação ocorre, maioritariamente, através de mutação. Uma lesão no ADN numa célula normal pode originar níveis elevados desta proteína, a qual se liga a este, conduzindo ao aumento da transcrição de determinados genes alvo, nomeadamente o p21 e o GADD45. Enquanto o primeiro é responsável pela paragem do ciclo celular, o segundo tem como função reparar o ADN. A este nível dois cenários podem ocorrer: a reparação é completa, sendo a proteína p53 rapidamente degradada ou o ADN não é reparado de forma eficaz. Se se verificar este último cenário, a p53 activa a proteína X associada à Bcl- 2 (BAX), a qual é um componente chave da cascata apoptótica, levando à morte celular (Kusewitt & Rush, 2007).

Outros genes, para além do GADD45, são responsáveis pela reparação do ADN. Se a funcionalidade destes se encontrar comprometida, através dos processos de metilação, deleção e mutação, o resultado será um conjunto de mutações genéticas, com consequente aumento da instabilidade genómica e da susceptibilidade para o desenvolvimento de tumores. Os genes BRCA1, BRCA2 e RAD51, ATM, MLH1 e MSH2, são alguns dos muitos genes localizados dentro deste grupo (Kusewitt & Rush, 2007). É de realçar que, a interacção observada entre a proteína RAD51 e as proteínas BRCA1 e BRCA2 assume bastante relevância (Scully et al., 1997). No entanto, somente BRCA2 interage directamente com RAD51, não se conhecendo ao certo a importância biológica da interacção indirecta entre BRCA1 e RAD51 (Scully et al., 1997; Boulton, 2006). No que diz respeito ao gene BRCA1, o qual codifica uma fosfo-proteína nuclear que participa na regulação do ciclo celular, foi realizado um estudo imunohistoquímico para avaliar a expressão desta proteína em tumores e displasias da glândula mamária, na espécie canina. Uma forte marcação imunohistoquímica foi observada no núcleo das células epiteliais do tecido mamário normal e displásico. Numa grande percentagem de tumores mamários

benignos e na maioria dos malignos, encontrava-se uma diminuição significativa da expressão nuclear de BRCA1, enquanto a nível citoplasmático verificou-se uma sobre-expressão. A perda de marcação desta proteína era observada, essencialmente, nos tumores que possuíam níveis elevados do marcador de proliferação celular Ki-67 e que eram negativos para REs- $\alpha$ . A redução da proteína BRCA1 e a sua aberrante distribuição celular encontravam-se, assim, relacionadas com características de malignidade (Nieto et al., 2003). Ainda na espécie canina, num estudo recente efectuado por Klopfleisch e Gruber (2009), mais especificamente numa comparação directa entre tumores mamários primários e secundários, constatou-se uma maior actividade dos genes BRCA1, BRCA2 e RAD51 nestes últimos. Tal facto permitiu concluir que estes genes sofrem um aumento de expressão, na maioria das metástases de tumores mamários presentes nos linfonodos regionais. Mais estudos serão necessários para clarificar se estas alterações genéticas representam um estímulo carcinogénico directo ou se são apenas uma resposta de protecção face à instabilidade genómica (Klopfleisch & Gruber, 2009).

Por fim, há outros genes envolvidos na génese do processo tumoral, denominados de oncogenes, que derivam dos proto-oncogenes. Estes últimos são encontrados em células normais, regulando o crescimento e diferenciação celulares. Os oncogenes podem ser activados de forma excessiva, promovendo assim o crescimento tumoral. Entre os mecanismos que levam ao aumento da expressão destes genes tem-se a amplificação e a mutação. Assim sendo, a região genómica que contém determinado oncogene pode ser amplificada fazendo com que, na célula, sejam encontradas várias cópias do gene. Se ocorrer uma mutação no oncogene analisado, pode haver uma activação constitucional ao nível do mesmo. Nestes casos, o gene encontra-se sempre activado, não respondendo a sinais inibitórios. Os oncogenes que sofrem este tipo de mutação são frequentemente os que codificam receptores da superfície celular, destacando-se o receptor do factor de crescimento epidérmico (EGF-R) (Kusewitt & Rush, 2007). Este receptor é um membro da família HER, sendo constituído por um domínio extracelular, ao qual se encontra ligado o EGF ou o TGF- $\alpha$ , e pelos domínios transmembranário e intracelular. Este último encontra-se associado à actividade desempenhada pela tirosina-quinase (Carpenter & Cohen, 1979). O EGF-R foi o primeiro receptor transmembranário tirosina-quinase a estar directamente ligado às neoplasias da espécie humana (Hynes & Lane, 2005), participando nos processos de proliferação e crescimento celulares, angiogénese e metastização e, por isso, encontra-se envolvido na sobrevivência e crescimento tumorais (Shien et al., 2005). A família HER inclui quatro receptores tirosina-quinase: EGF-R ou erbB1, HER-2/neu ou erbB2, HER-3 ou erbB3 e HER-4 ou erbB4 (Hynes & Lane, 2005; Park, Han, Shin, Kim & Kim, 2007; Sassen et al., 2008). Num estudo imunohistoquímico realizado por Gama, Gartner, Alves e Schmitt (2009), verificou-se a existência do EGF-R ao nível das células mioepiteliais, aquando da análise de

amostras de tecido mamário normal, hiperplásico e neoplásico benigno, na espécie canina. As células epiteliais luminais apresentavam-se negativas para a presença deste marcador. Assim sendo, a marcação imunohistoquímica deste receptor parece ter uma aplicabilidade diagnóstica na identificação de células mioepiteliais da glândula mamária, tal como acontece com outros marcadores, entre os quais a p63, a P-caderina, a  $\alpha$ -actina do músculo liso, a CK14 e a calponina (Destexhe, Lespagnard, Degeyter, Heymann & Coignoul, 1993; De los Monteros et al., 2002; Gama, Alves, Gartner & Schmitt, 2003; Gama, Paredes, Albergaria, Gartner & Schmitt, 2004). É ainda de realçar que, no referido estudo, foi verificado um aumento da expressão do EGF-R em 19,6% e 42,2% dos tumores mamários benignos e malignos, respectivamente. Também se observou que a positividade para este receptor estava, significativamente, relacionada com indicadores de malignidade histológica.

Alguns estudos foram também realizados, no sentido de avaliar a expressão do HER-2 nos tumores mamários. Nakopoulou et al. (1996) verificaram que a activação deste oncogene em neoplasias mamárias presentes na mulher deve-se maioritariamente à sua amplificação, podendo também estar implicado este mecanismo no que diz respeito ao EGF-R (Al-Kuraya et al., 2004; Reis-Filho et al., 2005; Reis-Filho et al., 2006). Tendo em conta a espécie canina, numa análise efectuada por Ahern, Bird, Allison, Bird e Wolfe (1996) foi encontrada uma sobre-expressão de HER-2 na maioria dos tumores mamários examinados. No entanto, se só se considerasse os tumores benignos, tal aspecto não era observado. Neste estudo, nenhuma associação foi encontrada entre este receptor e a existência de permeação vascular e de metástases regionais. Posteriormente e ainda considerando os canídeos domésticos, Rungsipipat et al. (1999), numa análise efectuada em 79 amostras de tecido mamário tumoral, observaram uma sobre-expressão deste marcador em 50% das neoplasias benignas e em 19,1% das malignas. Esta percentagem de tumores mamários malignos que expressam o marcador HER-2 é inferior à documentada por Ahern et al. (1996).

No que diz respeito à espécie felina, Millanta et al. (2005), numa análise imunohistoquímica efectuada em 47 carcinomas mamários, verificaram que 59,6% das amostras apresentava aumento da expressão de HER-2. Como se pode observar, esta percentagem é maior que a encontrada por Rungsipipat et al. (1999) na espécie canina, embora esta discrepância possa dever-se, em parte, a uma falta de uniformidade das metodologias utilizadas. No entanto, este valor obtido por Millanta et al. (2005) também se revelou superior ao verificado na mulher (Suo et al., 2002), tendo sido usado o mesmo método nos dois estudos. Tendo em conta o facto dos tumores mamários dos gatos apresentarem, geralmente, uma maior malignidade histológica relativamente às outras espécies, a maior expressão deste marcador nestes animais suporta esta ideia.

### 3.3. Outros factores

A obesidade é reconhecida como um factor de risco para o desenvolvimento de neoplasias mamárias na mulher, após a menopausa (Calle & Kaaks, 2004; Wu et al., 2006). Muitos estudos efectuados em animais, nomeadamente roedores (Klurfeld et al., 1991; Hakkak et al., 2005) e cães (Sonnenschein, Glickman, Goldschmidt & McKee, 1991), sugerem que este factor diminui o período de latência para a detecção de tumores mamários e/ou aumenta a incidência dos mesmos. No entanto, alguns estudos epidemiológicos geram controvérsia neste campo. No que diz respeito à espécie canina, numa análise efectuada por Sonnenschein et al. (1991), o fornecimento duma dieta rica em lípidos e/ou a presença de obesidade um ano antes do diagnóstico de tumor mamário não aumentavam a incidência destas neoplasias. Contudo, no mesmo estudo, tendo em conta apenas os cães castrados verificou-se que o risco de aparecimento de patologia tumoral apresentava-se significativamente reduzido nos animais com um menor peso corporal aos 9 a 12 meses de idade. Como tal, parece que os factores nutricionais, quando exercem o seu efeito em idades mais prematuras, desempenham um papel na etiologia dos tumores mamários.

A influência da obesidade no despoletar destas neoplasias pode ser explicada através das acções desempenhadas pelo estrogénio, leptina e adiponectina (Cleary, Grossman & Ray, 2010). O tecido adiposo é uma importante fonte de estrogénio devido à actividade da aromatase aí presente, a qual converte os androgénios em estrona, sendo parte desta convertida num estrogénio potente, o  $17\beta$ -estradiol. Consequentemente, o aumento do tecido adiposo pode contribuir para uma maior exposição das glândulas mamárias ao estrogénio (Enriori & Reforzo-Membrives, 1984; Simpson & Zhao, 1996). Tal facto levou a considerar esta hormona como um elo de ligação entre a gordura corporal e a indução de tumores mamários (Kendall, Folkard & Dowsett, 2007). Mais recentemente, na espécie humana, tem sido também atribuído um papel importante à adiponectina e leptina, na relação entre a obesidade e o desenvolvimento e progressão destas neoplasias. Estas substâncias são adipocitoquinas produzidas no tecido adiposo (Rose, Komninou & Stephenson, 2004; Barb, Pazaitou-Panayiotou & Mantzoros, 2006; Hou et al., 2007). As suas concentrações alteram-se, consoante o peso corporal, em direcções opostas. Assim sendo, quando o peso e o índice de massa corporais aumentam, os níveis séricos de leptina e adiponectina sobem e descem, respectivamente (Considine et al., 1996; Schindler et al., 2006; Behre et al., 2007).

Tendo em conta a leptina, esta foi primeiramente identificada, por Zhang et al. (1994), em experiências realizadas em roedores. Ishikawa, Kitayama e Nagawa (2004) verificaram que a sobre-expressão desta substância e de receptores da mesma, em tecido mamário neoplásico, encontrava-se associada à presença de metástases à distância. Garofalo et al.

(2006) observaram uma maior expressão destes dois marcadores nos tumores de grau de malignidade III. Noutro estudo recente, a presença de receptores da leptina apresentava uma correlação positiva com a expressão de REs e com o tamanho tumoral (Jarde et al., 2008). Alguns estudos, efectuados em culturas celulares, permitiram concluir que a leptina inibe a apoptose e estimula a proliferação celular (Konopleva et al., 1999; Artwohl et al., 2002; Fujita et al., 2002). Esta estimulação parece estar associada aos seguintes fenómenos: activação da ciclina D1, a qual desempenha um papel importante na regulação do ciclo celular, e do oncogene c-Myc e diminuição da actividade dos genes supressores tumorais p53 e p21 (Chen, Chang, Liu, Chang & Guo, 2006; Saxena, Vertino, Anania & Sharma, 2007).

No que diz respeito à adiponectina, verificou-se, em determinados estudos, que esta adipocitoquina reduz a proliferação celular e promove a apoptose, actuando de forma inversa à leptina. Ela é, assim, responsável por uma diminuição da expressão da ciclina D1 ao nível das células tumorais mamárias (Dieudonne et al., 2006; Arditi, Venihaki, Karalis & Chrousos, 2007). Também Cleary et al. (2010) relataram o efeito das duas adipocitoquinas nas glândulas mamárias. Assim sendo, num ambiente com baixos e altos níveis séricos de leptina e adiponectina, respectivamente, é mantido o balanço entre a proliferação celular e a apoptose. Contrariamente, se os níveis se encontrarem invertidos verifica-se uma redução da taxa de apoptose, ao mesmo tempo que ocorre estimulação do crescimento celular. O primeiro caso seria o correspondente ao que aconteceria, por exemplo, numa mulher obesa, enquanto o segundo é demonstrativo do ambiente presente nas glândulas mamárias numa mulher magra.

Alguns vírus podem estar envolvidos na tumorigénese. Há estudos que demonstram a presença de partículas virais em carcinomas mamários da espécie felina (Misdorp, 2002). Calafa, Weyer e Daams (1977) verificaram a existência de antigénios dos vírus FeLV e RD114 em 30,6% e 55,5% dos carcinomas analisados, respectivamente. No entanto, estes autores não encontraram, nos tumores benignos e em tecido mamário normal, quaisquer partículas virais. Também os retrovírus oncogénicos, pequenos vírus ARN, são capazes de despoletar muitas neoplasias de importância nos animais, podendo mesmo estar na etiologia de alguns adenocarcinomas mamários observados em ratos (Kusewitt & Rush, 2007).

Tendo em conta o factor radiação, num estudo efectuado em cães da raça Beagle, a incidência total de tumores mamários não variava, aquando da comparação entre o grupo de cães irradiados com RX e o grupo controlo. No entanto, verificou-se que a exposição à radiação predispunha os animais analisados a desenvolverem neoplasias a uma idade mais

prematura (Andersen & Rosenblatt, 1969; Moulton, Rosenblatt & Goldman, 1986; Misdorp, 2002).

## 4. Diagnóstico

### 4.1. Diagnóstico clínico e características macroscópicas

O diagnóstico clínico deve basear-se numa história pgressa o mais completa possível. Assim sendo, é necessário que esta contenha, entre outros aspectos, as seguintes informações acerca das lesões: data de início; tamanho, número, consistência e taxa de crescimento; possível fixação das lesões à pele e/ou a outros tecidos subjacentes; presença ou ausência de ulceração e de produto de secreção e ainda se são ou não acompanhadas de prurido. Também importantes são os dados sobre a idade, raça e sexualidade do animal. Estes últimos devem compreender, no caso de estarmos perante um paciente do sexo feminino, informações acerca da realização ou não de OVH e, nas situações em que a doente foi submetida a tal procedimento cirúrgico, a altura em que este foi efectuado. Para além disso, devem ser ainda considerados os seguintes aspectos: existência ou não de pseudo-gravidez e de irregularidades nos ciclos éstricos, data do último cio, possível administração de progestagénios e ocorrência de partos e lactações. Depois de realizada a história pgressa, é importante palpar todas as glândulas mamárias, tendo em conta que a palpação permite detectar nódulos a partir de 0,5 cm de diâmetro. Os linfonodos regionais também devem ser palpados. Posteriormente, deve ser efectuado o exame radiográfico do tórax, para detectar se existem metástases pulmonares. No entanto, a visualização destas últimas pode estar dificultada, no caso de possuírem uma pequena dimensão (menos de 0,5 cm) ou de se encontrarem tapadas pelo coração ou grandes vasos. Como tal, a obtenção dum exame radiográfico negativo não é garantia da inexistência de generalização do processo (Peleteiro, 1994; Solano-Gallego, 2010).

O sistema TNM (Tumor, Linfonodo e Metástase), proposto por Owen (1980), WHO, possibilita a determinação do estado ou fase de evolução do processo neoplásico, sendo somente aplicável aos carcinomas. No caso de tumores múltiplos, deve ser atribuída uma classificação individual, a cada neoplasia. Os tumores primitivos da mama podem ser classificados de T0 a T4, tendo em conta que o T0 utiliza-se no caso de «ausência de tumor primitivo evidente» ou «ausência de recidiva evidente». O grau T4 corresponde a um processo de gravidade máxima, em que as lesões apresentam diâmetro superior a 5 cm na cadela e a 3 cm na gata, havendo um forte envolvimento da pele e fixação das massas tumorais à parede torácica ou abdominal. Os carcinomas de grau T4 geralmente correspondem aos denominados carcinomas inflamatórios. As categorias de T1 a T3 são

ainda classificáveis de a, b ou c, consoante estamos perante um tumor não fixo, com fixação à pele ou ao músculo, respectivamente. Ao envolvimento dos linfonodos regionais são atribuídas as seguintes categorias: N0 (sem envolvimento dos linfonodos), N1 (com envolvimento dos linfonodos) e N2 (linfonodos bilaterais envolvidos). As categorias N1 e N2 ainda se subdividem em a ou b, sendo que a primeira subcategoria é aplicada quando os linfonodos se apresentam móveis, ao passo que a designação b é atribuída aos casos em que os mesmos se encontram fixos. Consoante o exame histopatológico confirme ou não o envolvimento dos linfonodos, pode utilizar-se ainda a notação (+) ou (-) a seguir à classificação da lesão. No que diz respeito à existência de metástases à distância, o processo pode ser classificado em M0 (sem metástases evidentes), M1 (metástases à distância, incluindo linfonodos não considerados regionais) e MX (impossível avaliar a existência de metástases). Com base na classificação TNM duma neoplasia ou dum conjunto de neoplasias mamárias, pode estabelecer-se qual a fase evolutiva ou estágio do processo («stage of disease»), tendo em consideração que, nas neoplasias múltiplas, a fase a considerar correcta é sempre a da neoplasia de categoria T mais elevada e, portanto, de maior gravidade. Com a realização do exame histopatológico, outras indicações se podem inscrever na classificação TNM, principalmente no que se refere ao grau de malignidade histológica da neoplasia (Peleteiro, 1994; Peleteiro & Correia, 1993).

No que diz respeito às características macroscópicas, os tumores mamários apresentam-se geralmente como massas sésseis ou pedunculadas, ulceradas ou cobertas com pele e pelo. As suas dimensões são variáveis, podendo atingir, na cadela, 20 cm de diâmetro, embora geralmente não ultrapassem os 10 cm. Na gata, as neoplasias raramente apresentam um tamanho superior a 8 cm. À superfície de corte, os tumores apresentam um aspecto sólido, quístico ou misto, observando-se, frequentemente, a existência de focos de necrose. Na cadela, as neoplasias encontram-se, por vezes, total ou parcialmente calcificadas, quando se verifica metaplasia óssea ou no caso dos osteossarcomas (figuras 2 e 3). As massas tumorais podem tomar uma aparência branca hialina, se estivermos perante a presença de metaplasia cartilágnea ou de tumor cartilágneo. Na gata, não se registam situações de metaplasia óssea ou cartilágnea e, ao contrário da cadela, em que são frequentes os tumores quísticos, a aparência sólida é a mais comum (Peleteiro, 1994; Fossum, 2007).

**Figura 2.** Cadáver de cadela com massa tumoral mamária, com cerca de 20 cm de diâmetro (original).



**Figura 3.** Corte sagital da massa tumoral da figura anterior (original).



À superfície de corte, o tumor apresenta um aspecto sólido, com zonas de calcificação e outras que correspondem a necrose.

## 4.2. Diagnóstico citológico

O diagnóstico citológico tem sido pouco explorado em cancerologia da mama na cadela e na gata, pelo menos comparativamente à sua ampla utilização na mulher (Peleteiro, 1994). Como tal, o índice de diagnósticos correctos obtidos por citologia de tumores mamários, em canídeos e felídeos domésticos, é inferior ao correspondente em medicina humana (Griffiths, Lumsden & Valli, 1984; Ménard, Fontaine & Morin, 1986; Allen, Prasse & Mahaffey, 1986). Entre os factores que contribuem para a dificuldade associada ao diagnóstico citológico está o facto de, com frequência, serem obtidas amostras inadequadas, o que dificulta a obtenção dum bom esfregaço, para além de que ainda é reduzida a experiência dos patologistas veterinários no que diz respeito à citologia mamária (Peleteiro, 1994). A amostragem deve ser realizada em múltiplas áreas do mesmo tumor e de tumores diferentes presentes no mesmo animal, devido à considerável heterogeneidade tecidual correspondente a estas lesões. É importante ter em atenção que o melhor local para obter amostras mais representativas é a periferia duma massa mamária, uma vez que a sua zona central é maioritariamente constituída por material necrosado, o qual pode impossibilitar a emissão dum diagnóstico. Também é de evitar as áreas flutuantes duma lesão, pois é provável que a amostragem realizada a este nível apenas resulte num líquido de baixa celularidade (Solano-Gallego, 2010). Assim sendo, é frequente as amostras inadequadas conterem inúmeras células necrosadas, sangue ou macrófagos revelando eritrofagia ou quantidades consideráveis de líquido no caso de tumores quísticos (Peleteiro, 1994).

Os esfregaços citológicos correspondentes a lesões da glândula mamária podem ser obtidos por aposição (Solano-Gallego, 2010), a partir do fluído resultante da compressão do teto (Monlux, Roszel, MacVean & Palmer, 1977; Solano-Gallego, 2010) ou por punção aspirativa com agulha fina (PAAF) (Solano-Gallego, 2010). A PAAF é uma técnica largamente utilizada em medicina humana, tendo sido, há algumas décadas, desenvolvida nos países nórdicos, nomeadamente na Suécia (Peleteiro & Rodrigues, 1991). Mesmo em medicina veterinária, a maior parte dos patologistas utiliza-a preferencialmente (Peleteiro, 1994), na medida em que a considera uma técnica simples, barata, inócua e rápida. Como o nome indica, trata-se dum método que permite aspirar uma pequena porção de tecido por intermédio duma agulha, cujo fino calibre possibilita intervir com um traumatismo mínimo para o animal. Esta técnica pode ser executada sem recurso a anestesia e sem realização de sutura. Para além disso, não é obrigatório o processamento do material obtido, visto este ser de imediato espalhado sobre uma lâmina (Peleteiro & Rodrigues, 1991). Quando combinado com os achados clínicos, o exame citológico de aspirados provenientes da glândula mamária é particularmente útil, no que diz respeito à diferenciação entre lesões não neoplásicas (hiperplasias, quistos), neoplásicas e inflamatórias (mastites) (Barton, 1983;

Magalhães, Ramadina, Barros & Peixoto, 2001; Solano-Gallego, 2010). A citologia também é importante na avaliação dos linfonodos regionais e de órgãos que são sede de metástases à distância (Solano-Gallego, 2010). No entanto, num estudo realizado por Zuccari, Santana e Rocha (2001) em 35 tumores mamários de cadelas, verificou-se que a PAAF é um procedimento pouco sensível (73%). Tal facto revela que esta técnica não deve ser utilizada isoladamente, mas sim como um método auxiliar em conjugação com o diagnóstico histopatológico. Por outro lado, ainda no mesmo estudo, a citologia aspirativa apresentava uma boa especificidade (83%), próxima da considerada adequada. Magalhães et al. (2001) verificaram que, no exame citológico, os adenomas são facilmente distinguíveis dos carcinomas. No entanto, Rutteman et al. (2001) não consideram a PAAF como sendo a técnica de diagnóstico mais indicada, na medida em que a distinção entre neoplasias benignas e malignas não implicaria a realização de mudanças no procedimento clínico efectuado face às mesmas, sendo que, dum modo geral, é recomendada a mastectomia. Para além disso, a maioria dos tumores de cadela apresenta uma composição celular mista, havendo necessidade de obter amostras em vários pontos das lesões. Tvedten (1994), numa abordagem face às limitações da citologia como meio de diagnóstico, defende que a descrição da neoplasia maligna, obtida através deste método, não é específica, sendo somente possível descrevê-la como se tratando por exemplo dum sarcoma ou carcinoma. Allen et al. (1986); Hellmén e Lindgren (1989); Peleteiro e Correia (1992); Peleteiro (1994) consideram o exame citológico, quanto à sua capacidade para emitir um diagnóstico correcto de malignidade («predictive positive value»), relativamente seguro, embora o mesmo não se verifique aquando da avaliação dum lesão benigna. A dificuldade em avaliar uma neoplasia benigna deve-se essencialmente ao facto da citologia aspirativa, obtida a partir desta, ser geralmente pobre em células, podendo conter vários elementos típicos dum mama normal, entre os quais adipócitos, sangue e algumas células do revestimento ductal. O diagnóstico de neoplasia maligna também se pode encontrar dificultado, no caso de, aquando da recolha da amostra, ter-se obtido um número reduzido de células. Nesta situação, o tumor maligno pode inclusive assumir a aparência dum neoplasia benigna (Peleteiro, 1994). A título de conclusão, pode dizer-se que a precisão da análise citológica face à emissão dum diagnóstico depende, em parte, do tipo e da localização da neoplasia (Mills & Griffiths, 1984).

Tendo em conta os critérios de malignidade aplicáveis na avaliação citológica dum esfregaço, verifica-se que estes baseiam-se na análise global das células e depois, mais especificamente, nos seus núcleos e nucléolos. Considerando as células como um todo, são indicadores de malignidade; a grande riqueza celular do esfregaço, o fraco grau de coesão (placas versus células livres) e a presença de células nuas em abundância. No que diz respeito aos núcleos, é necessário avaliar a sua variabilidade dimensional (anisocariose), a

presença de padrões irregulares de distribuição da cromatina (granular ou reticular) e a existência de figuras de mitose normais e anormais. Se se tiver em conta o nucléolo, são critérios de malignidade; a presença de vários nucleólos no mesmo núcleo e de macronucleólos (Allen et al., 1986; Peleteiro, 1994; Solano-Gallego, 2010).

No que diz respeito ao comportamento biológico das neoplasias mamárias, não foi encontrado nenhum estudo que comparasse este aspecto com o diagnóstico citológico. No entanto, considerando o diagnóstico histopatológico pode verificar-se, frequentemente, a presença duma fraca relação entre este e o comportamento tumoral (Solano-Gallego, 2010).

### **4.3. Diagnóstico histopatológico**

O diagnóstico histopatológico é fundamental para uma correcta apreciação de qualquer lesão suspeita de neoplasia mamária, podendo ser efectuado sobre o próprio tumor retirado cirurgicamente ou sobre um fragmento de biópsia cirúrgica. No entanto, como em medicina veterinária o tratamento cirúrgico continua a ser praticamente o único recomendado, o diagnóstico é geralmente realizado sobre a totalidade do tumor, não se justificando a realização de biópsia, excepto para alguns casos particulares, que incluem, por exemplo, recidivas de neoplasias em animais de idade avançada. Para um correcto exame histopatológico é fundamental analisar amostras provenientes de vários pontos do tumor, as quais devem conter não só tecido tumoral, como também zonas de transição entre as lesões e os tecidos aparentemente sãos. Desta forma, torna-se possível avaliar o grau de invasão local e da reacção inflamatória envolvente, bem como verificar se existem lesões de displasia mamária, que frequentemente acompanham os tumores (Peleteiro, 1994).

Aquando da caracterização histopatológica dos tumores mamários é necessário ter em conta os três graus de malignidade, que lhes são atribuíveis. Os graus I, II e III correspondem, respectivamente, a uma malignidade fraca, moderada e elevada. Os parâmetros que permitem definir qual o grau correspondente a um tumor são os seguintes: diferenciação (formação de tubos), anaplasia (anisocariose, a qual consiste na presença de núcleos com tamanhos diferentes) e mitoses (nº de mitoses em 10 campos, com objectiva de 40X). A cada um deles é atribuído um número de pontos, consoante determinadas características. Assim sendo, a diferenciação pode ser generalizada (1 ponto), em focos (2 pontos) ou inexistente (3 pontos), ao passo que a anisocariose pode ser classificada como fraca (1 ponto), moderada (2 pontos) ou intensa e generalizada (3 pontos). No que diz respeito às mitoses, se o número total for 0 a 4; 5 a 9 ou 10 ou mais, os pontos correspondentes são, respectivamente, 1; 2 ou 3 pontos. Tendo em conta o número total de pontos, a atribuição dos graus de malignidade é feita da seguinte forma: 3, 4 ou 5 pontos

(grau I); 6 ou 7 (grau II) e 8 ou 9 (grau III) (Bloom & Richardson, 1957; Lagadic & Estrada, 1990; Peleteiro, 1994).

Para um correcto diagnóstico histopatológico é necessário ter em conta a classificação histológica dos tumores mamários do cão e do gato, apresentada por Misdorp et al. (1999), WHO. Tendo em conta a espécie canina, as neoplasias mamárias malignas encontram-se classificadas nos seguintes tipos: carcinoma, tipos especiais de carcinoma, sarcoma, carcinosarcoma e carcinoma ou sarcoma em tumor benigno. Por sua vez, os tumores benignos encontram-se subdivididos em adenoma, fibroadenoma, tumor misto benigno e papiloma ductal. Para além das neoplasias benignas e malignas, existem os tumores não classificáveis e outras lesões não tumorais presentes na glândula mamária. Estas últimas são denominadas de hiperplasias/displasias mamárias que podem ser classificadas em hiperplasia ductal, hiperplasia lobular (hiperplasia epitelial e adenose), quistos, ectasia ductal, fibrose focal (fibroesclerose) e ginecomastia.

#### 4.3.1. Tumores mamários da espécie canina.

A classificação histológica a seguir apresentada foi proposta por Misdorp et al. (1999), WHO, sendo a que vulgarmente é utilizada pelos patologistas.

##### 4.3.1.1. Tumores mamários malignos

Considerando os carcinomas mamários e com base em resultados de estudos de prognóstico, efectuou-se uma subdivisão dos mesmos por ordem crescente de malignidade. Assim sendo, dentro do grupo dos carcinomas tem-se os seguintes tipos: carcinoma não infiltrativo (*in situ*), carcinoma complexo e carcinoma simples. O carcinoma simples ainda engloba os tipos túbulo-papilífero, sólido e anaplásico. Para melhor compreender as diferentes subdivisões acima mencionadas é feita, seguidamente, uma breve descrição acerca delas.

### **Carcinomas**

- **Carcinoma não infiltrativo (*in situ*):** Neoplasia epitelial com características histológicas de malignidade, embora não tendo invadido a membrana basal dos ductos pré-existent.
  
- **Carcinoma complexo:** Carcinoma constituído por dois componentes: epitelial luminal e mioepitelial. As células epiteliais luminiais podem assumir um padrão túbulo-

papilífero ou sólido. As células mioepiteliais, frequentemente do tipo fusiforme, apresentam uma disposição mais ou menos estrelada/reticulada. Neste tipo de neoplasia, a invasão dos vasos linfáticos não é frequente (10%). Este carcinoma é relativamente comum no cão e raro no gato.

- **Carcinoma simples:** Carcinoma composto por células do tipo epitelial luminal ou mioepitelial (apenas um tipo celular presente). Os tumores deste tipo possuem uma forte tendência para infiltrar os tecidos envolventes e para invadir os vasos sanguíneos e linfáticos (até 50% dos tumores). Tendo em conta a diferenciação e o comportamento biológico, os carcinomas simples podem ser subdivididos, segundo uma ordem crescente de malignidade, em carcinoma túbulo-papilífero, sólido e anaplásico;

- **Carcinoma túbulo-papilífero:** Carcinoma caracterizado pela formação de projecções tubulares e/ou papilíferas, o qual pode ser subdividido em carcinoma tubular, no caso de não possuir componente papilífera, e carcinoma papilífero, o qual não apresenta elementos tubulares. O tipo papilífero ocorre, frequentemente, no cão e no gato. O carcinoma papilífero-quístico, o qual pode ser difícil de diferenciar das lesões benignas, é uma variação do tipo túbulo-papilífero;

- **Carcinoma sólido:** Carcinoma caracterizado pela disposição das células tumorais em «cordões», «lençóis» ou «ninhos» sólidos. Este tipo tumoral é comum no cão e no gato;

- **Carcinoma anaplásico:** Carcinoma altamente infiltrativo, difuso, não classificável em nenhuma das outras categorias. Da sua constituição fazem parte células epiteliais de grandes dimensões, dispostas de forma isolada ou em grupo, pleomórficas, por vezes multinucleadas e, frequentemente, com núcleos bizarros ricos em cromatina. Entre estas células podem estar presentes neutrófilos e eosinófilos. Este tipo tumoral apresenta uma alta tendência para recidivar e metastizar, sendo relativamente comum no cão. No gato, a sua ocorrência nunca foi documentada.

- **Tipos especiais de carcinoma**

- **Carcinoma de células fusiformes:** Tumor maligno composto por células fusiformes, as quais, normalmente, se encontram dispostas segundo um padrão sólido, embora algumas possam formar túbulos. É provável que, em determinados casos, estes tumores tenham uma origem mioepitelial. Este tipo de carcinoma é relativamente raro no cão, nunca tendo sido descrito no gato;

- **Carcinoma escamoso:** Carcinoma com áreas de diferenciação escamosa, cujas células apresentam uma disposição segundo um padrão sólido. Na periferia do tumor, verifica-se a presença de células basalóides, ao passo que a parte central do mesmo é composta por queratina lamelar contendo células tumorais necrosadas. Este tipo tumoral ocorre raramente no gato, sendo que no cão surge de forma esporádica;
- **Carcinoma mucinoso:** Carcinoma caracterizado por uma abundante produção de mucina, podendo apresentar características do tipo simples ou complexo. Estes tumores ocorrem, raramente, no cão e no gato;
- **Carcinoma rico em lípidos:** Carcinoma constituído por células de citoplasma abundante e vacuolado contendo grande quantidade de lípidos neutros. Este tipo tumoral aparece, raramente, no cão.

### **Sarcomas**

- **Fibrossarcoma:** Tumor maligno dos fibroblastos, sendo, como tal, composto por células fusiformes e fibras de reticulina e colagénio. Estas últimas podem encontrar-se dispostas paralelamente ao acaso ou mesmo, em alguns tumores, à volta dos vasos sanguíneos neoformados;
- **Osteossarcoma:** Sarcoma caracterizado pela formação, por parte das células neoplásicas, de osteóide e/ou osso. Este tipo tumoral engloba os osteossarcomas puros não combinados e os tumores combinados. Estes últimos são compostos por tecidos dos tipos cartilaginoso e ósseo, embora também se possa verificar a presença de tecido adiposo e/ou conjuntivo fibroso. A actividade mitótica e o pleomorfismo celulares são, normalmente, proeminentes. Os osteossarcomas ocorrem, maioritariamente, no cão;
- **Outros sarcomas:** Os condrossarcomas e lipossarcomas puros são extremamente raros.

### **Carcinossarcoma**

Tumor composto por células morfológicamente idênticas a componentes dos tecidos epitelial (mioepitelial e/ou luminal) e mesenquimatoso. As metástases de carcinossarcoma podem ser do tipo sarcomatoso, carcinomatoso ou misto. Tal como acontece com o carcinoma

complexo, a sobrevivência pós-cirúrgica associada a esta neoplasia é relativamente longa. Este tipo de tumor aparece de forma esporádica no cão, sendo extremamente raro no gato.

### **Carcinoma ou sarcoma em tumor benigno**

Tumor do tipo adenoma complexo ou tumor misto benigno, que apresenta focos distintos de células com aparência maligna. Neste tipo tumoral, normalmente é difícil perceber se a componente maligna surgiu associada ao tumor benigno ou se invadiu, posteriormente, este. Um exemplo deste tipo de neoplasia é o osteossarcoma em tumor misto benigno. Na altura do exame histopatológico, grande parte da componente benigna pode já ter sido substituída pela maligna. Estes tumores ocorrem, ocasionalmente, no cão.

#### 4.3.1.2. Tumores mamários benignos.

### **Adenomas**

- **Adenoma simples:** Neoplasia benigna composta por células mioepiteliais ou epiteliais luminais. Os tumores constituídos por túbulos com epitélio luminal bem diferenciado são do tipo tubular. No cão podem estar presentes os denominados mioepiteliomas, os quais são caracterizados pelo crescimento de células fusiformes benignas dispostas segundo um padrão sólido. Os adenomas simples são extremamente raros no cão e no gato;
  
- **Adenoma complexo:** Tumor benigno constituído por células epiteliais luminais e por outras de aparência mioepitelial. A distinção entre este tipo tumoral e os carcinomas complexos bem diferenciados pode ser difícil. No entanto, determinadas características como, por exemplo, a presença de encapsulação e duma baixa actividade mitótica, bem como a ausência de necrose e de atipias celulares, contribuem para a classificação do tumor como adenoma. Esta neoplasia é comum no cão, surgindo, com menos frequência, no gato;
  
- **Adenoma basalóide:** Neoplasia benigna composta por grupos de células epiteliais basalóides monomórficas. Inicialmente, este tipo tumoral foi descrito como ocorrendo exclusivamente em cadelas da raça Beagle, às quais tinham sido administradas progestinas. Mais estudos são necessários para uma melhor caracterização destas lesões.

### **Fibroadenoma (alta celularidade e baixa celularidade)**

Tumor benigno que consiste numa mistura de células epiteliais luminais e do estroma, por vezes em conjugação com células mioepiteliais. Nesta neoplasia, os tipos peri-canalicular e intra-canalicular podem ser identificados. O fibroadenoma de alta celularidade pode conter uma grande quantidade de células em mitose. Este tipo tumoral é relativamente comum no cão e no gato.

### **Tumor misto benigno**

Neoplasia constituída por células morfologicamente idênticas a componentes epiteliais (luminal e/ou mioepitelial) e outras de tipo mesenquimatoso. Estas últimas podem produzir cartilagem, osso e/ou gordura e, eventualmente, também tecido conjuntivo fibroso. Os tumores mistos benignos são frequentes no cão e raros no gato.

### **Papiloma ductal**

Tumor benigno complexo ou simples localizado dentro dum ducto distendido, podendo apresentar-se lobulado ou com ramificações. A distinção entre papiloma ductal e adenoma complexo intraductal pode ser extremamente difícil, particularmente no gato. Esta lesão tumoral é rara em ambas as espécies.

#### 4.3.1.3. Lesões mamárias não neoplásicas (hiperplasias/displasias mamárias).

### **Hiperplasia ductal**

Lesão não neoplásica caracterizada pela proliferação intraductal de células epiteliais conduzindo, às vezes, a uma obstrução parcial ou total do lúmen dos ductos extralobulares. A hiperplasia pode ser difusa ou multifocal. Quando está presente um grande número de atípias, este tipo lesional sofre a designação de hiperplasia ductal atípica.

### **Hiperplasia lobular**

- **Hiperplasia epitelial:** Proliferação não neoplásica de células epiteliais que ocorre ao nível dos ductos intralobulares;
- **Adenose:** Proliferação não neoplásica das células do epitélio ductal, mioepitélio e tecido conjuntivo fibroso. O padrão de crescimento pode ser intraductal e/ou periductal. A adenose é muito menos frequente no cão e no gato, em comparação com a mulher.

**Quistos e ectasias ductais**

As ectasias ductais podem ser muito difíceis de diferenciar dos quistos. No entanto, as ectasias são geralmente mais pequenas e de reconhecível origem ductal. A formação de quistos pode ser muito proeminente no gato.

**Fibrose focal (fibroesclerose)**

Este tipo lesional surge, por vezes, associado à hiperplasia lobular ou ductal, embora todas as outras displasias possam apresentar algum grau de fibrose.

**Ginecomastia**

Esta lesão consiste numa hiperplasia dos ductos e do estroma. Verifica-se, a sua ocorrência, ao nível das glândulas mamárias dos cães machos, podendo estar relacionada com a existência de Sertolinomas.

**4.3.2. Tumores mamários da espécie felina**

Nos tumores mamários da espécie felina e ainda considerando a classificação histológica proposta por Misdorp et al. (1999), WHO, é de realçar o facto de não haver a classificação simples/complexo para os carcinomas. Para além disso, tais autores descrevem o tipo cribiforme como sendo um tipo histológico que aparece frequentemente no gato (tumor sólido com pequenas aberturas, assemelhando-se a um crivo).

Nas gatas pode surgir outro tipo de hiperplasia/displasia mamária denominada de alteração fibroadenomatosa (antigamente designada de hipertrofia mamária felina ou hipertrofia fibroepitelial). Este tipo lesional está englobado nas hiperplasias lobulares e consiste na proliferação, induzida hormonalmente, dos ductos intralobulares. A lesão é normalmente acompanhada por edema e encontra-se envolvida por um estroma de tecido conjuntivo fibroso, sendo normalmente não encapsulada, podendo ocupar uma ou várias glândulas mamárias. O seu rápido crescimento pode ser alvo de alguma preocupação. No entanto, na medida em que a sua etiologia se encontra associada ao efeito prolongado da progesterona, uma vez terminada a gravidez e/ou o tratamento com progestinas, pode haver regressão desta hiperplasia (Misdorp et al., 1999, WHO).

## 5. Metastização e invasão tumorais

Os tumores malignos são, com frequência, altamente invasivos, não respeitando as barreiras anatómicas, infiltrando o tecido adjacente normal. Contrariamente, os tumores benignos são geralmente expansivos e não invasivos. As fronteiras entre uma neoplasia benigna e os tecidos adjacentes são normalmente bem visíveis, apresentando-se os tumores de origem epitelial muitas vezes encapsulados (rodeados por uma cápsula de tecido conjuntivo). O aspecto mais marcante na distinção entre tumores malignos e benignos, é o facto dos primeiros apresentarem capacidade de metastizar, embora existam algumas neoplasias malignas não metastáticas. As metástases ocorrem quando colónias de células tumorais se encontram situadas a alguma distância do tumor primitivo. Podem ser utilizadas, para a metastização tumoral, as seguintes vias: transcelómica, linfática e hematogénea ou sanguínea. A maioria dos carcinomas metastiza por intermédio do sistema linfático, ao passo que os sarcomas utilizam, preferencialmente, a via hematogénea. No entanto, em alguns carcinomas e sarcomas pode haver permeação de vasos sanguíneos e linfáticos, respectivamente. No que diz respeito à via linfática, o padrão de envolvimento dos linfonodos é, normalmente, dependente da drenagem linfática pré-existente. Sendo assim, os linfonodos mais próximos do tumor (regionais) tendem a ser os primeiros a sofrer metastização, denominada de regional. Posteriormente, as células neoplásicas invadem estruturas distantes (metastização à distância). Relativamente à via sanguínea, os tumores invadem mais frequentemente veias que artérias, na medida em que estas últimas apresentam uma maior espessura de parede comparativamente às primeiras. As células neoplásicas ao entrarem nas veias podem atingir, posteriormente, a veia cava e/ou o sistema portal e alojarem-se ao nível dos pulmões e/ou fígado, respectivamente (Kusewitt & Rush, 2007).

O processo de metastização e invasão por células neoplásicas engloba os seguintes passos: invasão da matriz extracelular (MEC), permeação de vasos linfáticos ou sanguíneos, saída das células tumorais de dentro dos vasos e colonização do local metastático. Para que o primeiro processo tenha lugar, é necessário que algumas células tumorais se destaquem da «massa tumoral» e penetrem através da membrana basal, de forma a atingir a matriz. Assim sendo, têm de ocorrer um conjunto de alterações respeitantes às adesões entre células e entre células e matriz. É então fundamental que as células que sofrem migração percam as suas estruturas de adesão intercelular, incluindo os desmossomas. Nos tumores de origem epitelial ocorre perda da função desempenhada pelas proteínas cateninas e caderinas, as quais são importantes elementos estruturais das junções intercelulares (Kusewitt & Rush, 2007). As caderinas interagem com as cateninas ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ), as quais são responsáveis pela ligação das primeiras à actina do citoesqueleto. Para além disso, as cateninas actuam como mediadores de mecanismos que controlam,

entre outros eventos celulares, a polaridade, a diferenciação, o crescimento e a migração das células (Knudsen, Frankowski, Johnson & Wheelock, 1998). Relativamente à glândula mamária é importante distinguir a E-caderina, a qual se encontra localizada nas células epiteliais luminais, e a P-caderina, que apresenta apenas expressão ao nível das células mioepiteliais (Shimoyama et al., 1989; Palacios et al., 1995; Gama et al., 2002; Gama, Paredes, Albergaria, Gartner & Schmitt, 2004). Ao mesmo tempo que as células se destacam umas das outras, verifica-se o estabelecimento de contacto entre elas e a MEC, por intermédio de receptores presentes na membrana celular. Estes receptores, entre os quais se destacam as integrinas, reconhecem e ligam-se a uma variedade de componentes da matriz, tais como a fibronectina, o colagénio, a laminina e a vitronectina. É importante não esquecer que, para haver invasão da MEC, é necessário ocorrer degradação da membrana basal e de componentes da matriz. Com esta finalidade, as células tumorais ou as células normais do estroma, sendo estas últimas induzidas pelas células neoplásicas, produzem e activam proteases e anti-proteases, havendo um aumento da actividade das primeiras relativamente às segundas. Algumas das proteases que desempenham um importante papel na metastização, são a uroquinase e as metaloproteinases da matriz como, por exemplo, a colagenase tipo IV (Kusewitt & Rush, 2007).

Depois de invadida a MEC, a migração das células tumorais em direcção aos vasos linfáticos e sanguíneos é estimulada por factores de crescimento autócrinos e por produtos resultantes da clivagem da matriz, entre os quais o colagénio. Uma vez dentro dos vasos, tende a haver uma associação entre as células tumorais, no sentido de formarem um êmbolo, o qual pode ser atacado por linfócitos ou rodeado por plaquetas. Estas últimas podem mesmo proteger o êmbolo e facilitar a metastização tumoral (Kusewitt & Rush, 2007).

Posteriormente, as células neoplásicas encontram um sítio de saída através dos vasos, em direcção à estrutura que sofre metastização. O ponto de extravasão depende do padrão de drenagem linfática e sanguínea e da capacidade das células tumorais para interagirem com as moléculas de adesão celular, presentes ao nível do endotélio. É de realçar que o sítio de metastização tem de providenciar um ambiente adequado para o crescimento tumoral (Kusewitt & Rush, 2007).

À semelhança do que acontece no tumor primário, o processo de metastização pode ter a sua origem num conjunto de alterações genéticas e epigenéticas, existindo também genes supressores de metástases. Um exemplo destes genes é o que codificada para a E-caderina (Kusewitt & Rush, 2007).

No que diz respeito aos tumores das glândulas mamárias e na medida em que os carcinomas mamários metastizam por via linfática, sendo então esta a principal via de metastização das neoplasias mamárias (MacEwen et al., 1984), torna-se indispensável a realização duma breve descrição acerca da drenagem linfática presente ao nível destas glândulas. Num estudo efectuado por Patsikas et al. (2006), usando a técnica de linfografia indirecta em 41 cadelas, foi possível identificar quais os principais linfonodos regionais, respeitantes aos cinco pares de glândulas mamárias neoplásicas. Assim sendo, as mamas torácicas cranial e caudal drenavam, normalmente, para os linfonodos axilares ipsilaterais e, raramente, para os linfonodos axilares e esternais ipsilaterais, simultaneamente. Pereira, Rahal, Baliero e Ribeiro (2003) também descreveram a existência de vasos linfáticos a conectarem a primeira glândula mamária torácica aos linfonodos cervicais superficiais, embora, no estudo realizado por Patsikas et al. (2006), não tenham sido observados tais linfonodos. Os linfonodos regionais da glândula mamária cranial abdominal correspondiam, na maioria dos casos, aos axilares e inguinais superficiais ipsilaterais, simultaneamente, embora às vezes só se encontrassem envolvidos os axilares. Raramente, esta mama drenava apenas, caudalmente, em direcção aos linfonodos inguinais superficiais e mediais ilíacos ipsilaterais. A existência duma via linfática que conecta a terceira glândula mamária aos linfonodos mediais ilíacos, pode explicar a presença de metástases nos pulmões sem haver envolvimento dos linfonodos inguinais superficiais e axilares, embora a utilização da via hematogénea também possa ser uma das explicações para tal acontecimento (Davidson, 2003). Também é de admitir que, na cadela, as células neoplásicas possam ter atingido o pulmão através de pequenos vasos linfáticos, localizados ao longo dos ramos perfurantes das artérias torácicas internas (Brearley, 1989; Peleteiro, 1994). Tais factos podem explicar o porquê de surgirem casos de metastização pulmonar sem sinais dos linfonodos locais terem sido afectados (Peleteiro, 1994). Ainda no estudo realizado por Patsikas et al. (2006), verificou-se que a glândula mamária abdominal caudal neoplásica geralmente drenava apenas em direcção aos linfonodos inguinais superficiais ipsilaterais. Pouco frequentemente, esta mama estabelecia conexões simultâneas com os linfonodos axilares e inguinais superficiais ipsilaterais. Por último, os linfonodos regionais da glândula mamária inguinal neoplásica foram observados como correspondendo, normalmente, aos linfonodos inguinais superficiais, embora, raramente, esta mama drenasse ipsilateralmente também para o linfonodo poplíteo e em direcção a um plexo linfático localizado no lado medial da coxa. Num dos casos analisados, no referido estudo, observou-se a existência de conexões linfáticas entre as glândulas mamárias neoplásicas e normais adjacentes.

O padrão de drenagem linfática das mamas com tumor é ligeiramente diferente do descrito em situações não patológicas. Apesar de existirem variações anatómicas entre animais, tal achado suporta a hipótese da ocorrência de linfangiogénese durante o processo neoplásico,

a qual permite que vasos linfáticos inactivos na glândula mamária normal se tornem activos (Werner, 1995; Pereira et al., 2003). O desenvolvimento de nova vasculatura linfática partilha muitos aspectos em comum com a angiogénese (formação de novos vasos sanguíneos). Tanto os vasos sanguíneos como os vasos linfáticos neoformados derivam da vasculatura pré-existente, em resposta a factores angiogénicos secretados pelas células tumorais, tais como o VEGF. A angiogénese depende, assim, do balanço entre factores angiogénicos e anti-angiogénicos. Este fenómeno é essencial ao crescimento contínuo dos tumores, não só porque permite o fornecimento de oxigénio e nutrientes aos mesmos, como também pelo facto das células endoteliais produzirem factores de crescimento, entre os quais a IL-1 e o factor de crescimento derivado das plaquetas. Para além disso, tanto a linfangiogénese como a angiogénese desempenham papéis fundamentais na metastização. Os vasos sanguíneos neoformados são geralmente mais tortuosos, dilatados e permeáveis que os outros (Kusewitt & Rush, 2007).

De forma a obter uma melhor compreensão da drenagem linfática das glândulas mamárias na espécie felina, Raharison e Sautet (2006) realizaram um estudo em 50 gatas. Verificaram então, que as mamas torácica caudal e abdominal cranial podem drenar, caudalmente, para o centro linfático inguinal superficial e/ou, cranialmente, para os linfonodos axilares. Também constataram que as glândulas mamárias torácica cranial e abdominal caudal drenam apenas cranialmente e caudalmente, respectivamente. Ainda no referido estudo, verificou-se o facto das mamas torácica cranial e abdominal cranial terem, frequentemente, conexões com os linfonodos esternais craniais. No entanto, constatou-se que 100% das glândulas mamárias torácicas caudais analisadas drenavam em direcção a estes linfonodos. Assim sendo, nesta análise, o limite entre as direcções cranial e caudal da drenagem linfática só pode estar presente entre as mamas torácica caudal e abdominal cranial embora, segundo Vollmerhaus e Roos (1997), tal transição possa existir entre quaisquer glândulas mamárias. Apesar de Mailot, Lagneau, Parodi e André (1980) terem mencionado a existência de conexões linfáticas entre as glândulas mamárias torácica cranial e caudal e entre as mamas abdominal cranial e caudal, no estudo realizado por Raharison e Sautet (2006) não foram observadas ligações entre glândulas mamárias adjacentes. Os resultados obtidos, por estes últimos autores, demonstraram que a drenagem linfática em direcção aos linfonodos é unilateral. No entanto, tal facto opõe-se ao observado por Patsikas e Dessiris (1996a), que verificaram a existência de conexões linfáticas entre os linfonodos inguinais superficiais heterolaterais. Raharison e Sautet (2006) também não encontraram vasos linfáticos que conectassem as duas cadeias mamárias, ao contrário do observado, por alguns autores, no cão (Pereira et al., 2003; Stan, Gudea, Damian & Socaciu, 2007; Stan et al., 2009). Na medida em que o estudo realizado por Raharison e Sautet (2006) incidiu sobre glândulas mamárias normais, torna-se recomendável a análise em mamas com tumor,

para verificar se, na espécie felina, existe alteração da unilateralidade da drenagem linfática pelo processo neoplásico (Raharison & Sautet, 2006).

Tendo em conta os locais de metastização dos tumores mamários, sabe-se que estas neoplasias metastizam, principalmente, para os linfonodos regionais e pulmões (figura 4) e, menos frequentemente, ao nível do fígado, baço, rins, pele, esqueleto, encéfalo (figura 5), glândulas adrenais e coração (Peleteiro, 1994; Fossum, 2007). Na gata é comum encontrar metástases nos folhetos parietal e visceral da pleura, com consequente derrame pleural (figura 6) (Queiroga, 2010). Parece haver uma tendência para os sarcomas metastizarem mais precocemente que os carcinomas. No entanto, uma vez que os primeiros são observados em número inferior relativamente aos segundos (menos de 5% dos tumores mamários malignos da cadela são sarcomas), tal conclusão poderá não ser a mais correcta (Peleteiro, 1994; Fossum, 2007).

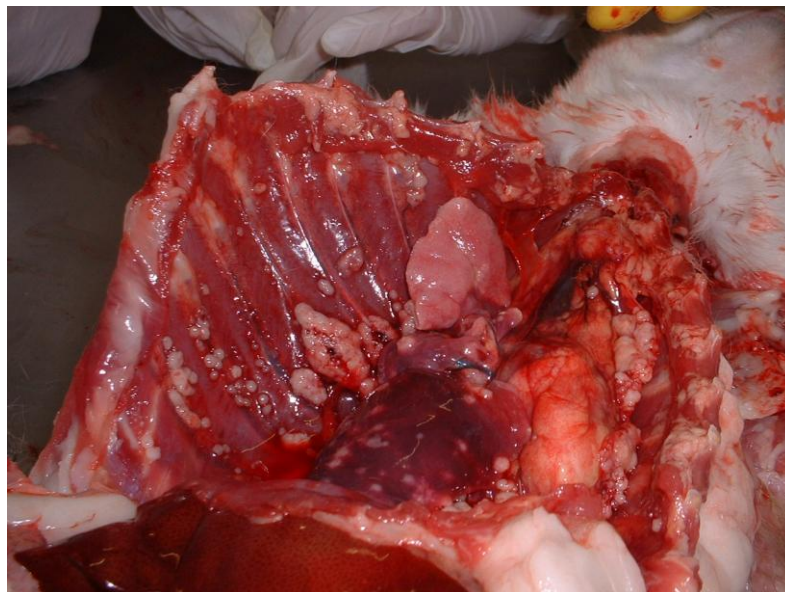
**Figura 4.** Metástases pulmonares de neoplasia mamária, em cadela (original).



**Figura 5.** Metástase de neoplasia mamária localizada ao nível do encéfalo, em cadela (original).



**Figura 6.** Metástases de neoplasia mamária localizadas a nível pulmonar e pleural, em gata (original).



## 6. Prognóstico

Nas neoplasias mamárias da espécie canina tem-se como principais indicadores de prognóstico os seguintes factores: tipo histológico tumoral e determinadas características imunohistoquímicas, grau de invasão tecidual, permeação vascular, fixação à pele e/ou tecidos subjacentes, presença de ulceração, grau de diferenciação nuclear e aneuploidia do ADN, número de células em fase S, grau de reactividade celular linfóide, tamanho tumoral, envolvimento dos linfonodos, actividade dos receptores hormonais, grau histológico de malignidade (Pérez-Alenza, Peña, Del Castillo & Nieto, 2000; Misdorp, 2002; Fossum, 2007), idade (Hellmén et al., 1993; Misdorp et al., 1999, WHO; Pérez-Alenza et al., 2000) e dieta (Misdorp et al., 1999, WHO; Pérez-Alenza et al., 2000; Misdorp, 2002).

Num estudo realizado por Karayannopoulou, Kaldrymidou, Constantinidis e Dessiris (2005), em 85 cadelas com carcinomas mamários, foram avaliados alguns factores de prognóstico. Uma das conclusões retiradas pelos autores consistiu no facto do número de mortes observado não variar apenas consoante o grau de malignidade, mas também encontrar-se dependente do tipo histológico, sendo este último um factor de prognóstico bem conhecido (Misdorp, 2002; Williams, 2003; Fossum, 2007). Karayannopoulou et al. (2005) encontraram uma correlação entre estes dois indicadores, sendo que os carcinomas complexos e os carcinomas em tumor benigno possuíam, maioritariamente, grau de malignidade I ou II. Por outro lado, aos carcinomas simples correspondia o grau II ou III. Como tal, estes últimos tumores apresentavam um prognóstico menos favorável, relativamente aos primeiros. Também outros autores, considerando apenas o tipo histológico, afirmam haver um aumento de malignidade em termos do comportamento biológico tumoral desde os carcinomas complexos até aos carcinomas simples, sendo os sarcomas os mais malignos (Misdorp & Hart, 1976; Else & Hannant, 1979; Parodi et al., 1983; Misdorp et al., 1999, WHO; Misdorp, 2002). Nos estudos realizados em cães por Hellmén et al. (1993) e por Pérez-Alenza et al. (2000) os sarcomas também foram considerados o tipo tumoral com maior malignidade.

No que diz respeito ao envolvimento dos linfonodos, muitos autores descreveram tal aspecto como sendo um importante factor de prognóstico na espécie canina (Hellmén et al., 1993; Yamagami, Kobayashi, Takahashi & Sugiyama, 1996; Misdorp, 2002). No estudo realizado por Karayannopoulou et al. (2005) a presença de metástases nos linfonodos era um indicador de pior prognóstico, na medida em que a sobrevivência das cadelas que apresentavam envolvimento dos linfonodos encontrava-se significativamente reduzida, em comparação com o grupo que não possuía metástases regionais.

Atendendo à idade dos cães aquando da mastectomia, Hellmén et al. (1993); Misdorp et al. (1999), WHO e Pérez-Alenza et al. (2000) consideram-na como sendo um indicador de prognóstico, uma vez que quando a idade é mais avançada o prognóstico tende a ser pior.

O tamanho tumoral também é reconhecido como sendo um factor importante de prognóstico na espécie canina, visto que os tumores pequenos, geralmente, estão associados a um melhor prognóstico comparativamente com os de maior diâmetro (Yamagami et al., 1996; Misdorp, 2002; Williams, 2003). No entanto, Else e Hannant (1979); Hellmén et al. (1993) e Karayannopoulou et al. (2005) não encontraram nenhuma relação significativa entre este indicador e o número de mortes.

Tendo em conta os receptores hormonais presentes nas neoplasias mamárias de cães, diversos autores descreveram a sua ausência como estando relacionada com um pior prognóstico (Martin, Cotard, Mialot, André & Raynaud, 1984; Misdorp et al., 1999, WHO; Misdorp, 2002 ; De las Mulas, Millán & Dios, 2005).

As reacções celulares linfóides indicam a existência de uma resposta imune anti-tumoral e têm sido associadas a uma menor taxa de recorrência (Gilbertson, Kurzman, Zachrau, Hurvitz & Black, 1983) embora, segundo Misdorp (2002), ainda não sejam consideradas como um factor de prognóstico reconhecido e bem aceite na espécie canina.

Determinados marcadores detectados, imunohistoquimicamente, ao nível dos tumores mamários podem auxiliar no estabelecimento dum prognóstico. Entre eles tem-se a Ciclooxygenase-2 (COX-2), o Ki-67, o Antígeno Nuclear de Células em Proliferação (PCNA), a p53, a proteína homóloga da fosfatase e tensina (PTEN), as caderinas e a Catecol-O-Metiltransferase (COMT).

Num estudo realizado por Lavallo, Bertagnolli, Tavares e Cassali (2009), em 46 amostras de tumores mamários de cadelas, foi verificada uma correlação positiva entre os níveis de expressão da proteína COX-2 e a densidade em micro-vasos, sendo que ambos se encontravam relacionados com um pior prognóstico. É importante ter em conta que a COX-2 é uma enzima que participa na formação de prostaglandinas, as quais podem mediar mecanismos associados à proliferação celular, apoptose, modulação do sistema imunitário e angiogénese (Grosch, Maier, Schiffmann & Geisslinger, 2006). Numa análise anterior efectuada por Doré, Lanthier e Sirois (2003) foi observada, nos tumores malignos da espécie canina, uma maior expressão de COX-2 comparativamente com os benignos. Considerando a espécie felina, dois estudos reportaram a existência de COX-2 na maior parte das neoplasias mamárias analisadas, na medida em que numa das análises este marcador era expresso em 96% dos tumores avaliados (Millanta, Citi, Della Santa, Porciani & Poli, 2006) e no outro estudo realizado por Sayasith, Sirois e Doré (2009) esta enzima

estava presente em 87% dos carcinomas analisados. No entanto, nenhum dos referidos estudos avaliou a importância da COX-2 no prognóstico dos tumores mamários do gato.

Peña, Nieto, Pérez-Alenza, Cuesta e Castaño (1998) demonstraram que os níveis elevados de expressão do marcador de proliferação celular Ki-67 (MIB-1 index) apresentavam-se positivamente correlacionados com a existência de metástases e com a baixa taxa de sobrevivência dos cães analisados. Também Zuccari, Santana, Cury e Cordeiro (2004) verificaram que a positividade das células tumorais face ao Ki-67 encontrava-se directamente relacionada com a malignidade comportamental dos tumores da espécie canina. Como tal, a expressão do Ki-67 tem sido considerada como um importante factor de prognóstico, podendo contribuir para a previsão do comportamento biológico das neoplasias mamárias desta espécie (Misdorp et al., 1999, WHO; Pérez-Alenza et al., 2000).

No que diz respeito a outros marcadores de multiplicação celular, tais como o PCNA, alguns estudos efectuados no cão também permitiram constatar a existência de uma correlação positiva entre a malignidade e a taxa de proliferação (Preziosi, Sarli, Benazzi & Marcato, 1995; Lohr, Teifke, Failing & Weiss, 1997; Funakoshi et al., 2000).

Atendendo à p53 e ainda na espécie canina, muitos autores afirmam que as mutações ao nível desta proteína encontram-se relacionadas com a progressão tumoral (Greenblatt, Bennett, Hollstein & Harris, 1994; Mayr, Dressler, Reifinger & Feil, 1998; Veldhoen, Watterson, Brash & Milner, 1999). Numa análise realizada por Lee et al. (2004), em neoplasias mamárias de cães, verificou-se que a sobre-expressão de p53 mutada encontrava-se relacionada com a presença dum pior prognóstico.

Considerando a PTEN, sabe-se que esta proteína é codificada por um gene supressor tumoral (Tamguney & Stokoe, 2007), participando, assim, em múltiplos mecanismos de defesa celular contra a transformação e progressão neoplásicas (Maehama & Dixon, 1998; Kotelevets et al., 2001; Freeman et al., 2003; Kotelevets et al., 2005). Num estudo efectuado por Ressel, Millanta, Caleri, Innocenti e Poli (2009), em neoplasias mamárias de cães, observou-se uma correlação positiva entre a perda de expressão da proteína PTEN e os seguintes parâmetros: presença de permeação vascular e de metástases regionais e à distância, ocorrência de recidiva tumoral, baixa sobrevivência do animal, tipo histológico carcinoma simples e indiferenciação tumoral. Sendo assim, é provável que esta perda de expressão possa ser considerada um indicador de pior prognóstico.

A enzima COMT, cujo gene codificador apresenta dois polimorfismos (Masuda, Hashizume, Kikusui, Takeuchi & Mori, 2004), é responsável pela inactivação dos estrogénios catecol, os quais são metabólitos com propriedades carcinogénicas (Cavalier et al., 1997; Cavalier, Frenkel, Liehr, Rogan & Roy, 2000). Num estudo efectuado por Pereira et al. (2009), em 80

cadela com tumores mamários, verificou-se que os animais que possuíam, simultaneamente, ambos os polimorfismos do gene tinham uma maior probabilidade de desenvolver recidivas de neoplasia mamária. Assim sendo, parece que os genótipos COMT podem influenciar a progressão clínica destes tumores.

No que diz respeito às caderinas, Brunetti, Sarli, Preziosi, Monari e Benazzi (2005) demonstraram que a redução da expressão de E-caderina/ $\beta$ -catenina em neoplasias mamárias da espécie canina predispõe para uma maior capacidade invasiva dos tumores, embora não tenham encontrado qualquer influência da mesma sobre a proliferação celular e sobrevivência dos cães analisados. Por sua vez, segundo um estudo realizado por Matos et al. (2006) em canídeos domésticos, existe uma relação entre a diminuição de E-caderina e o maior tamanho tumoral, a presença de metástases nos linfonodos, o crescimento infiltrativo dos tumores e a existência de ulceração e necrose ao nível dos mesmos. Numa análise efectuada por Gama, Paredes, Gartner, Alves e Schmitt (2008), em 65 tumores mamários malignos de cães, verificou-se que a perda de expressão de E-caderina encontrava-se correlacionada com o aumento do tamanho tumoral, um elevado índice mitótico, a presença de metástases nos linfonodos e um alto grau de malignidade e de invasão do tumor. Aquando do seguimento de 35 casos (dos 65 anteriormente estudados), os mesmos autores constataram que a diminuição da expressão destas proteínas encontrava-se associada a uma inferior taxa de sobrevivência dos animais e a um menor período livre de doença.

As Regiões Organizadoras Nucleolares Argirofílicas (AgNORs) são exemplo de outros marcadores com importância em termos de prognóstico, para além dos já mencionados anteriormente. Assim sendo, verificou-se que os cães com neoplasias mamárias que apresentavam uma baixa expressão de AgNORs tinham um melhor prognóstico, relativamente aos que possuíam este marcador em elevada quantidade, sendo que a sobrevivência média após o diagnóstico da doença correspondia a 22 e 14 meses, respectivamente (Preziosi, Sarli, Benazzi, Mandrioli & Marcato, 2002; Fossum, 2007).

Ainda a propósito da espécie canina, Gilbertson et al. (1983) propuseram um sistema de classificação numérica baseado em diversos aspectos relacionados com o prognóstico. Deste sistema faziam parte os seguintes indicadores de prognóstico: o grau de proliferação e de atipia do epitélio ductal em tumores não invasivos; a diferenciação nuclear; a reacção linfocitária de natureza inflamatória e a fase evolutiva das neoplasias malignas. Este último critério de classificação é utilizado na apreciação da extensão e do carácter invasivo de uma neoplasia. Como tal, são considerados quatro estádios de evolução tumoral, sendo eles os estádios 0, I, II e III. No estádio 0 estão incluídos os tumores em que a proliferação celular maligna está confinada ao ductos, não havendo invasão do estroma. Do estádio I fazem parte os tumores invasivos que apenas invadem as estruturas locais, verificando-se a

ausência de invasão de vasos sanguíneos e linfáticos por células neoplásicas aquando do exame histopatológico. No entanto, no estágio II já se observa a existência de permeação vascular bem como a ocorrência de metastização nos linfonodos regionais. Por último, tem-se o estágio III, estando nele englobados os casos em que se verifica a presença de metástases à distância durante a avaliação clínica da doença neoplásica (Gilbertson et al., 1983; Peleteiro, 1994).

Os carcinomas mamários da espécie felina são conhecidos por terem, no geral, um prognóstico grave, devido à sua forte tendência para metastizar e recidivar localmente (Misdorp et al., 1999, WHO). Num estudo efectuado nesta espécie por Weyer e Hart (1983), foram encontrados os seguintes factores independentes indicadores dum pior prognóstico: idade avançada do animal, grande diâmetro do tumor primário, existência de necrose ao nível da lesão tumoral, excisão cirúrgica incompleta e, em termos histopatológicos, presença de metástases regionais e dum elevado índice mitótico. Else e Hannant (1979), MacEwen et al. (1984) e Fossum (2007) afirmaram que nas gatas que apresentavam neoplasias com menos de 8 cm<sup>3</sup>, o intervalo livre de doença e o tempo de sobrevivência global eram maiores, comparativamente aos casos em que os tumores tinham um volume superior a este valor. Sendo assim, estes autores consideraram também o volume tumoral como sendo um importante indicador de prognóstico em neoplasias da espécie felina.

### **III. Estudo da patologia presente nas glândulas mamárias de canídeos e felídeos domésticos.**

#### **1. Objectivos**

Na presente dissertação foi realizado um estudo de um ano e meio sobre a patologia encontrada ao nível das glândulas mamárias de canídeos e felídeos domésticos durante este período. Este estudo incidiu, maioritariamente, na análise epidemiológica das neoplasias mamárias encontradas nestes animais, tendo-se procedido à caracterização das mesmas em termos histopatológicos e de metastização, para além de ter sido efectuada a caracterização da amostra populacional em estudo.

#### **2. Material e métodos**

Os dados utilizados para a realização deste estudo foram obtidos através dos registos das análises histopatológicas, respeitantes a lesões encontradas ao nível das glândulas mamárias, efectuadas no Laboratório de Anatomia Patológica da FMV-UTL no período de tempo compreendido entre 1 de Janeiro de 2009 e 30 de Junho de 2010. Estas análises foram realizadas a partir de material processado, o qual era constituído por fragmentos representativos das amostras de glândulas mamárias extirpadas cirurgicamente e enviadas para o laboratório e, sempre que possível, por pelo menos um dos linfonodos regionais. Por cada nódulo/massa tumoral com um diâmetro inferior a 3 cm e por cada linfonodo recolhido foi efectuado um corte, enquanto nas massas com mais de 3 cm foram realizados dois cortes por peça. Posteriormente, os fragmentos obtidos foram incluídos em parafina, utilizando para o efeito um processador de tecidos LEICA TP 1020 (anexo III). Após a inclusão, foram realizados, por intermédio dum micrótopo, cortes de 4µm de espessura. Por fim, efectuou-se a coloração dos mesmos com Hematoxilina & Eritrosina (H&E) (anexo III).

Com base na informação fornecida pelas análises histopatológicas foi criada uma base de dados constituída pelos seguintes parâmetros: ano e número da análise; características do animal, nomeadamente no que diz respeito à espécie, raça, idade em anos e sexo; número de mamas afectadas e caracterização histopatológica da lesão. Considerando este último parâmetro foram analisados os aspectos apresentados de seguida: se a lesão se tratava duma neoplasia benigna ou maligna ou dum processo não tumoral, ambos com origem mamária ou se a lesão encontrada era originária de tecidos que não faziam parte da

glândula mamária; no caso de estarmos perante um tumor mamário, foi tida em conta a classificação histológica do mesmo (tipo histológico; complexo ou simples e misto ou não misto), o grau de malignidade histológica, a existência ou não de permeação vascular e de metástases nos linfonodos regionais analisados. A base de dados foi criada e analisada no programa Microsoft EXCEL<sup>R</sup>. Para uma melhor compreensão dos resultados, é necessário ter em conta alguns dos critérios de classificação aplicados:

- Para facilitar a análise estatística e na medida em que o estudo teve como objectivo a avaliação dos resultados como um todo, não se justificou a criação de duas bases de dados independentes para o ano 2009 e 2010;
- No que diz respeito à raça dos animais, sempre que esta correspondia a um cruzamento com uma raça pura, foi-lhe atribuída a denominação de Híbrida;
- Quanto ao parâmetro sexo, foi considerado o facto de os animais terem sido ou não castrados antes do procedimento cirúrgico para excisão da lesão;
- No que diz respeito ao tipo histológico, todos os tumores do tipo túbulo-papilífero foram denominados de tubular;
- No caso dos linfonodos recolhidos apresentarem metastização de neoplasia mamária, só foi considerada a existência de permeação vascular quando esta foi visualizada no exame histopatológico.

### **3. Resultados**

#### **3.1. Caracterização da amostra populacional**

A amostra populacional estudada é constituída por 588 animais, os quais se podem dividir em 364 e 224 canídeos e felídeos domésticos, respectivamente.

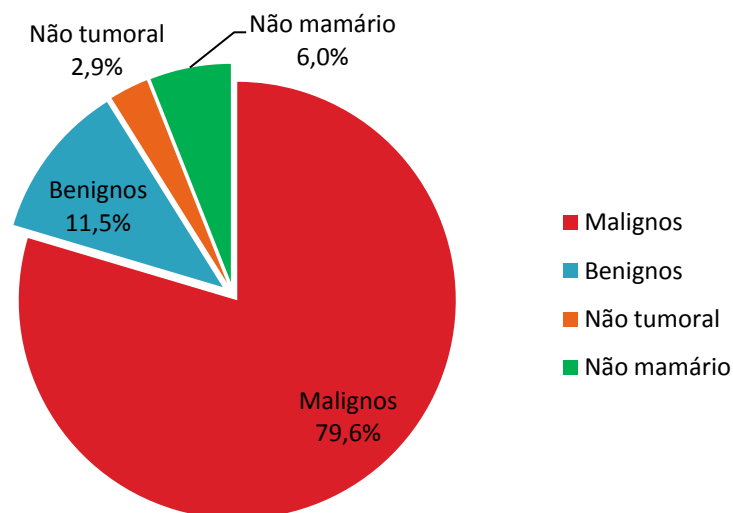
##### **3.1.1. Canídeos**

###### **3.1.1.1. Caracterização e distribuição da patologia presente nas glândulas mamárias.**

Verificou-se que, na amostra populacional de cães estudada, as neoplasias malignas com origem na glândula mamária constituíam a patologia observada com maior frequência, na medida em que dos 416 casos estudados, 331 (79,6%) apresentavam estes tumores. Quanto às restantes lesões presentes a nível mamário, observou-se que as neoplasias benignas da mama correspondiam a um total de 48 casos (11,5%), ao passo que aos processos patológicos com origem não mamária e à patologia não tumoral da glândula mamária estavam associados 25 (6%) e 12 (2,9%) casos, respectivamente. Concluiu-se

então que o número total de casos correspondentes a neoplasias mamárias era de 379. É importante ter em conta que, apesar de terem sido estudados 364 cães, o número total de casos considerados na presente análise foi superior, devido ao facto de alguns animais apresentarem simultaneamente nas glândulas mamárias processo tumoral benigno e maligno e por vezes mais do que um tumor maligno. No entanto, no que diz respeito ao número total de cães que apresentavam neoplasias mamárias, considerando apenas a divisão em dois casos independentes consoante a natureza maligna ou benigna da lesão, verificou-se que 299 animais eram portadores de tumores malignos, ao passo que 48 possuíam patologia tumoral benigna, o que constitui um total de 347 casos. A caracterização e distribuição da patologia presente ao nível das glândulas mamárias dos canídeos domésticos encontra-se representada no gráfico 1.

**Gráfico 1.** Caracterização e distribuição da patologia presente ao nível das glândulas mamárias, nos cães.

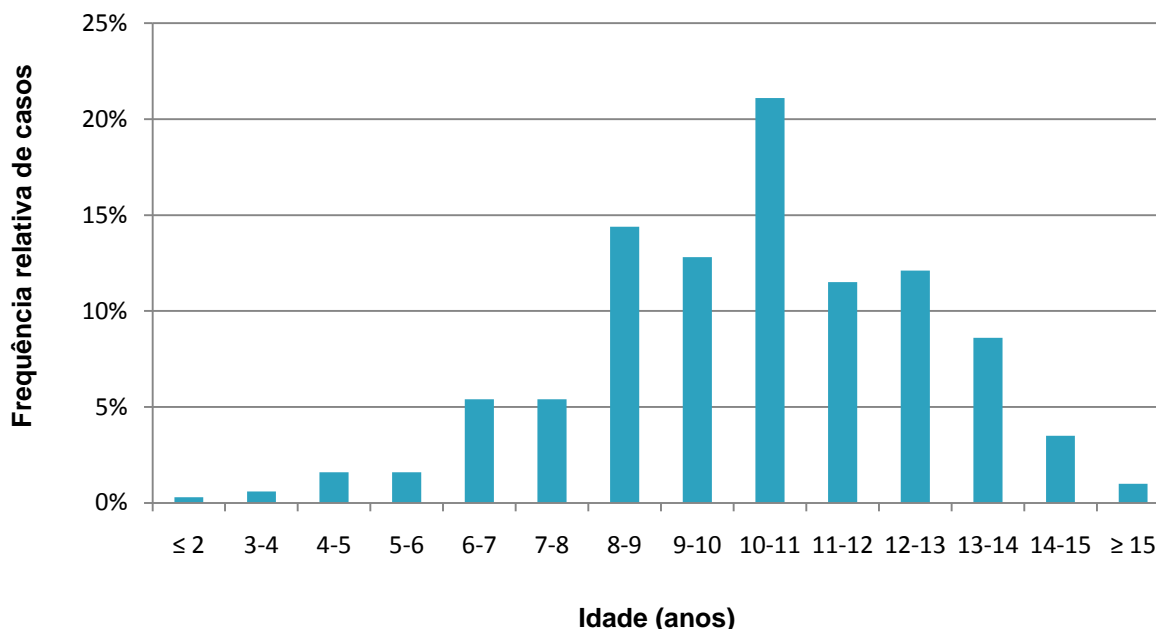


#### 3.1.1.2. Caracterização e distribuição etárias dos canídeos com tumores mamários.

A idade correspondente aos casos de neoplasias mamárias em canídeos variou entre 2 e 16 anos, sendo que aos 10 anos observou-se um maior número de animais (66 casos; 21,1%). A média de idades correspondia ao valor de 9,8 anos. É de notar que, dos 327 animais com neoplasias mamárias (do total de 364 cães, retiraram-se os que apresentavam patologia não mamária ou lesões não tumorais mamárias) 14 eram de idade desconhecida, não tendo sido estes considerados na obtenção dos resultados. Sendo assim, a amostra era constituída por 313 casos. Outro aspecto a ter em conta é o facto de 95% dos casos observados

corresponderem a uma faixa etária aproximada entre os 5 e os 15 anos. A distribuição e caracterização etárias encontram-se apresentadas no gráfico 2 e na tabela 1.

**Gráfico 2.** Distribuição etária dos canídeos com tumores mamários.



**Tabela 1.** Caracterização etária dos canídeos com tumores mamários.

	Mínimo	Máximo	Média	Moda	Mediana	Desvio-padrão	IC (95%)
<b>Idade (anos)</b>	2	16	9,8	10	10	2,4	5 -14,6

### 3.1.1.3. Avaliação do sexo dos canídeos com tumores mamários.

Na presente análise foi tida em conta a divisão entre tumores benignos e malignos, embora não tenha sido considerada a diferenciação ao nível destes últimos. Assim sendo, a amostra utilizada consistiu em 334 dos 347 casos de tumores mamários em canídeos, na medida em que 13 eram de sexo desconhecido. Verificou-se que, a maior parte dos canídeos com tumores mamários pertencia ao sexo feminino, havendo uma maior frequência absoluta de fêmeas inteiras relativamente às que foram submetidas a ovariectomia (244 face a 87 casos). No entanto, constatou-se que a percentagem de fêmeas inteiras e ovariectomizadas com tumores mamários era praticamente igual (91,4% e 91,6% respectivamente), não havendo então uma diferença significativa entre os dois grupos de fêmeas, no que diz respeito à taxa de incidência tumoral. Segundo o resultado do teste de

Qui-quadrado, a incidência de tumores mamários é independente do estado hormonal das fêmeas ( $p \geq 0,05$ ) (anexo I, tabelas 1.5). Também foi possível observar uma maior frequência relativa de fêmeas ovariectomizadas com tumores benignos (16 casos; 18,4%), em comparação com as fêmeas inteiras (31 casos; 12,7%). O oposto verificou-se no que diz respeito à frequência relativa de casos com tumores malignos, sendo esta ligeiramente superior nas fêmeas inteiras (213 animais; 87,3% face a 71 casos; 81,6%). No entanto, com o teste de Qui-quadrado verificou-se que o facto de o tumor ser benigno ou maligno é independente do estado hormonal das fêmeas (anexo I, tabelas 1.4). Quanto ao grupo dos machos inteiros, a maior parte apresentava tumores mamários, sendo todos eles malignos (60%). Os restantes animais do sexo masculino possuíam lesões de origem não mamária. A distribuição dos canídeos consoante o sexo encontra-se representada na tabela 2.

**Tabela 2.** Distribuição da amostra populacional de canídeos em função do sexo.

	<b>Fêmeas inteiras</b>	<b>Fêmeas ovariectomizadas</b>	<b>Machos inteiros</b>
<b>Total de casos com ou sem tumores mamários</b>	267	95	5
<b>Total de casos com tumores mamários</b>	244	87	3
<b>Frequência relativa de casos com tumores mamários (%)</b>	91,4	91,6	60
<b>Frequência relativa de casos com tumores mamários benignos (%)</b>	12,7	18,4	0
<b>Frequência relativa de casos com tumores mamários malignos (%)</b>	87,3	81,6	60
<b>Frequência relativa dos sexos na amostra populacional (%)</b>	72,8	25,9%	1,4%

#### 3.1.1.4. Caracterização da raça dos canídeos com tumores mamários.

Aquando da análise dos cães com tumores mamários segundo a raça, verificou-se que o tipo de raça atribuído se encontrava dividido em três grupos: raça pura, híbrida (cruzamento com pelo menos uma raça pura) e indeterminada. O número total de casos associados a raça pura, indeterminada e híbrida eram 217 (67,8%), 93 (29,1%) e 10 (3,1%),

respectivamente. Tendo em conta as raças puras identificadas, constatou-se que as três raças mais frequentemente registadas no conjunto das análises estudadas eram, por ordem decrescente, o Caniche (44 cães; 13,8%), o Cocker (37 casos; 11,6%) e o Yorkshire Terrier (22 cães; 6,9%). No entanto, os animais de raça indeterminada correspondiam a uma maior frequência absoluta e relativa observadas, em relação a qualquer raça pura individualmente considerada. O número de casos não classificados quanto ao tipo de raça correspondiam a um total de 7 animais, não tendo sido estes utilizados na obtenção dos valores de frequência relativa e absoluta. A amostra era então constituída por 320 cães com tumores mamários. As tabelas 3 e 4 apresentam a distribuição dos canídeos com neoplasias mamárias segundo a raça.

**Tabela 3.** Distribuição dos cães com tumores mamários consoante as raças puras.

<b>Raça pura</b>	<b>Frequência absoluta</b>	<b>Frequência relativa (%)</b>
Caniche	44	13,8
Cocker	37	11,6
Yorkshire Terrier	22	6,9
Boxer	14	4,4
Retriever do Labrador	12	3,8
Rottweiler	10	3,1
Husky	9	2,8
Golden Retriever	8	2,5
Pastor Alemão	6	1,9
Samoiedo	5	1,6
Schnauzer	5	1,6
Dobermann	4	1,3
Bichon Maltês	3	0,9
Pinscher	3	0,9
Baixote	3	0,9
Outras raças	32	10
<b>Total de casos com raça pura</b>	<b>217</b>	<b>68</b>

**Tabela 4.** Distribuição dos cães com tumores mamários consoante os tipos de raça.

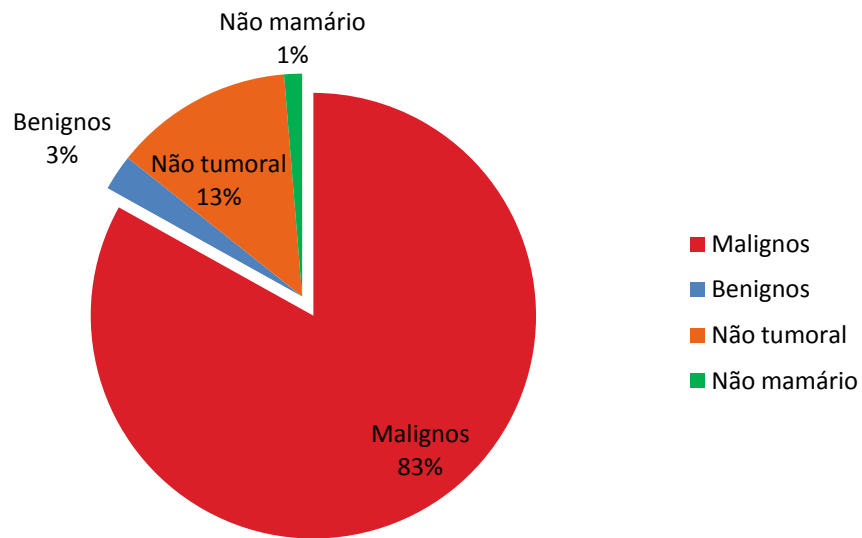
<b>Tipo raça</b>	<b>Frequência absoluta</b>	<b>Frequência relativa(%)</b>
Raça pura	217	67,8
Híbrida	10	3,1
Indeterminada	93	29,1
Total de casos com tipo de raça classificado	<b>320</b>	<b>100</b>

### 3.1.2. Felídeos

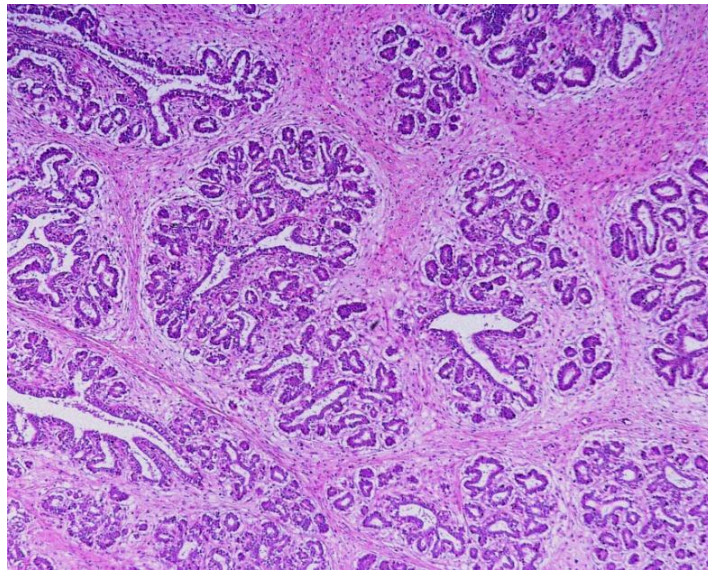
#### 3.1.2.1. Caracterização e distribuição da patologia presente nas glândulas mamárias.

Após a análise da patologia presente nas glândulas mamárias concluiu-se que, na amostra populacional de gatos estudados, as neoplasias malignas com origem mamária constituíam a patologia observada com maior frequência (191 casos; 83%). Verificou-se que, a segunda patologia mais frequente englobava as lesões não tumorais mamárias (figura 7), correspondendo esta a uma percentagem de 13% (30 animais). Foi observado um menor número de casos, no que diz respeito aos tumores benignos (6 gatos; 3%) e processos patológicos de origem não mamária (3 animais; 1%). Concluiu-se então, que o número total de neoplasias mamárias era de 197, as quais pertenciam a 191 gatos (185 com tumores malignos e 6 com tumores benignos), na medida em que alguns animais apresentavam mais de uma neoplasia maligna. Sendo assim, também o número de casos correspondentes a patologia localizada na glândula mamária (230) era superior ao número de animais analisados (224). O gráfico 3 é representativo dos aspectos acima descritos.

**Gráfico 3.** Caracterização e distribuição da patologia presente nas glândulas mamárias dos gatos.



**Figura 7.** Alteração fibroadenomatosa (lesão não tumoral) (original).

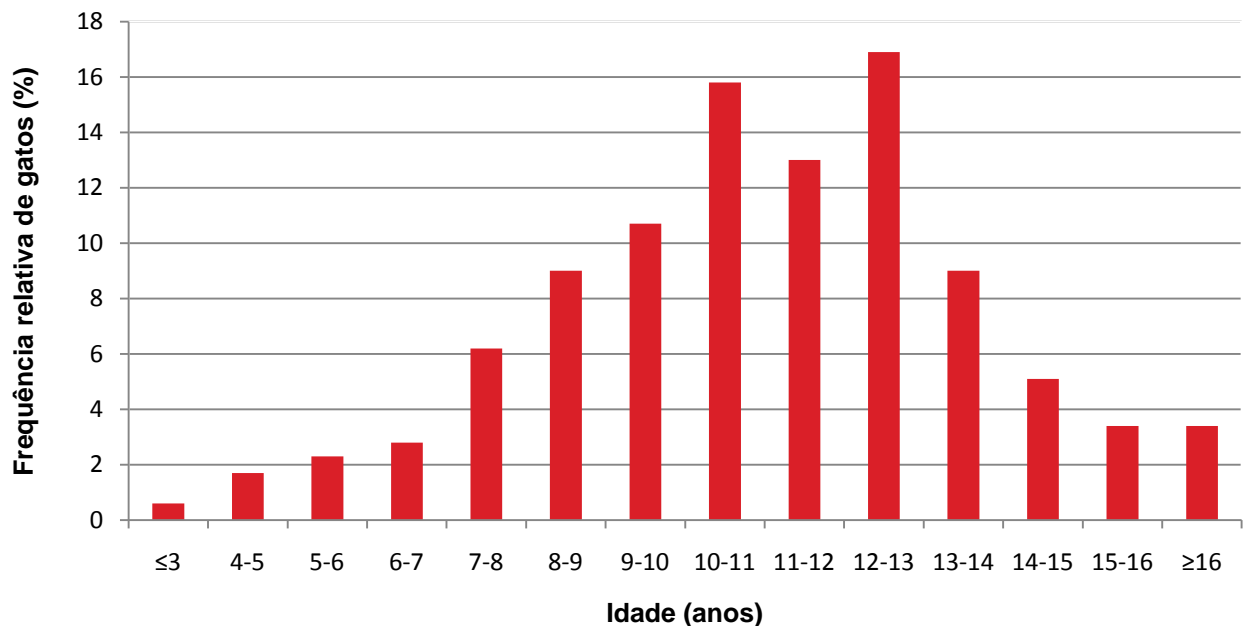


Hiperplasia fibroadenomatosa da glândula mamária. Na figura é visível a proliferação dos ductos intralobulares, os quais se encontram envolvidos por um estroma fibroso que sofreu hiperplasia. Felídeo, Europeu Comum, 4 anos. 40X, H&E.

## 3.1.2.2. Caracterização e distribuição etárias dos felinos com tumores mamários.

A idade dos gatos afectados por neoplasias mamárias variou entre 3 e 19 anos, sendo que aos 12 anos foi observado um maior número de animais. A média de idades correspondia a 10,5 anos. Verificou-se que um dos gatos, do sexo masculino, que apresentava lesão não tumoral mamária, possuía uma idade inferior a um ano (8 meses), embora tal tipo lesional não tenha sido analisado. É de notar que, dos 191 felinos com tumores 14 tinham idade desconhecida, não tendo estes sido considerados aquando da obtenção dos resultados. Outro aspecto observado consistiu no facto de 95% dos animais corresponderem a uma faixa etária aproximada entre os 5 e os 16 anos. O gráfico 4 e a tabela 5 apresentam a caracterização e distribuição etárias dos felinos com neoplasias mamárias.

**Gráfico 4.** Distribuição etária dos gatos com neoplasias mamárias.



**Tabela 5.** Caracterização etária dos gatos com neoplasias mamárias.

	Mínimo	Máximo	Média	Moda	Mediana	Desvio-padrão	IC (95%)
<b>Idade (anos)</b>	3	19	10,5	12	11	2,8	5-16,1

### 3.1.2.3. Avaliação do sexo dos felídeos com tumores mamários.

A análise da amostra populacional de felinos permitiu verificar que a maior parte dos animais correspondia ao sexo feminino, tendo-se observado uma maior frequência absoluta e relativa de fêmeas inteiras, relativamente às ovariectomizadas. De facto, mais de metade dos animais com patologia ao nível das glândulas mamárias eram fêmeas inteiras (126 casos, 58,1%). No entanto, foi também observada uma percentagem considerável de fêmeas ovariectomizadas (40,1%), as quais apresentavam uma taxa de incidência de tumores mamários ligeiramente superior à encontrada nas fêmeas inteiras (88,5% face a 84,9%). Relativamente ao número total de casos correspondentes a tumores, observou-se uma maior frequência relativa de fêmeas inteiras com tumores benignos (4 casos; 3,7%) em comparação com as fêmeas ovariectomizadas (2 casos; 2,6%). Verificou-se o oposto no que diz respeito à frequência relativa de casos com tumores malignos, sendo esta ligeiramente superior nas fêmeas ovariectomizadas (97,4% face a 96,3%; 75 e 103 casos, respectivamente). No entanto, segundo os resultados dos testes de Qui-quadrado efectuados, a incidência de tumores mamários malignos e benignos ou mesmo de neoplasias mamárias no geral é independente do estado hormonal das fêmeas ( $p \geq 0,05$ ) (anexo I, tabelas 2.4 e 2.5). Tanto em fêmeas inteiras como ovariectomizadas, como seria de esperar, constatou-se que a grande maioria das neoplasias apresentada era maligna, tendo-se verificado que, do total de fêmeas inteiras e ovariectomizadas com tumores mamários, só em quatro (3,7%) e em dois (2,6%) animais foram observados tumores benignos, respectivamente. Da amostra populacional de gatos analisados também faziam parte quatro machos, sendo que dois deles (50%) eram inteiros e possuíam tumores malignos. No que diz respeito aos outros dois machos, um era castrado e apresentava patologia de origem não mamária e o outro era inteiro e possuía um processo patológico não tumoral mamário. É importante verificar que, para a obtenção dos valores de frequência absoluta e relativa, dos 224 gatos com patologia nas glândulas mamárias só foram considerados 217, na medida em que 7 eram de sexo desconhecido. No que diz respeito aos casos correspondentes a tumores mamários, tendo em conta apenas a divisão tumor benigno/maligno, foram somente analisados 186, uma vez que 5 não possuíam qualquer informação relativa ao sexo. A distribuição dos felídeos consoante o sexo encontra-se representada na tabela 6.

**Tabela 6.** Distribuição da amostra populacional de gatos em função do sexo.

	<b>Fêmeas inteiras</b>	<b>Fêmeas ovariohisterectomizadas</b>	<b>Machos</b>
<b>Total de gatos com ou sem tumores mamários</b>	126	87	4
<b>Total de gatos com tumores mamários</b>	107	77	2
<b>Frequência relativa dos gatos com tumores mamários (%)</b>	84,9	88,5	50
<b>Frequência relativa dos gatos com tumores mamários benignos (%)</b>	3,7	2,6	0
<b>Frequência relativa dos gatos com tumores mamários malignos (%)</b>	96,3	97,4	50
<b>Frequência relativa dos sexos na amostra populacional de gatos (%)</b>	58,1	40,1	1,8

#### 3.1.2.4. Caracterização da raça dos felídeos com tumores mamários.

Verificou-se que, no caso da espécie felina os indivíduos de raça pura que apresentavam tumores mamários encontravam-se em quantidade superior aos de raça indeterminada e híbrida, destacando-se os animais da raça Europeu Comum (77,6%; 135 casos). Seguidamente, os com maior representatividade eram os persas (13 gatos; 7,5%) e, por último, os siameses (11 casos; 6,3%). Constatou-se então que estas três raças eram as mais frequentes no conjunto das análises estudadas. É de notar que 17 dos animais não apresentavam tipo de raça classificado, só tendo sido considerados para a obtenção dos valores de frequência absoluta e relativa, 174 casos dos 191 que possuíam tumores mamários. As tabelas 7 e 8 apresentam a distribuição dos gatos com neoplasias mamárias segundo a raça.

**Tabela 7.** Distribuição dos gatos com tumores mamários consoante as raças puras.

<b>Raça pura</b>	<b>Frequência absoluta</b>	<b>Frequência relativa (%)</b>
Europeu Comum	135	77,6
Persa	13	7,5
Siamês	11	6,3
Bosque da Noruega	1	0,6
Total de casos com raça pura	<b>160</b>	<b>92</b>

**Tabela 8.** Distribuição dos gatos com tumores mamários consoante o tipo de raça.

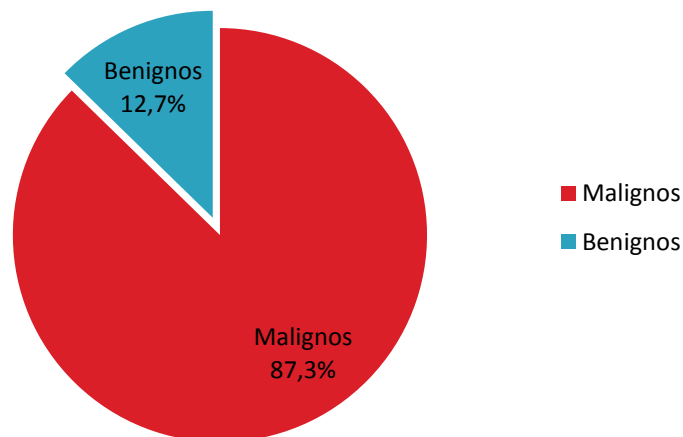
<b>Tipo de raça</b>	<b>Frequência absoluta</b>	<b>Frequência relativa (%)</b>
Raça pura	160	92
Híbrida	12	6,9
Indeterminada	2	1,2
Total de casos com tipo de raça classificado	<b>174</b>	<b>100</b>

## 3.2. Comparação entre tumores mamários benignos e malignos.

### 3.2.1. Canídeos

#### 3.2.1.1. Distribuição dos tumores malignos e benignos nos canídeos.

Considerando como amostra o número total de casos correspondentes a tumores mamários na espécie canina (n=379 casos), excluindo então os que se encontravam associados a lesões não tumorais da mama e a outros processos patológicos não mamários, verificou-se que os tumores benignos e malignos correspondiam a 48 (12,7%) e 331 (87,3%) casos, respectivamente. Constatou-se assim, mais uma vez, uma predominância das neoplasias malignas face às benignas. O gráfico 5 representa a distribuição dos tumores mamários malignos e benignos.

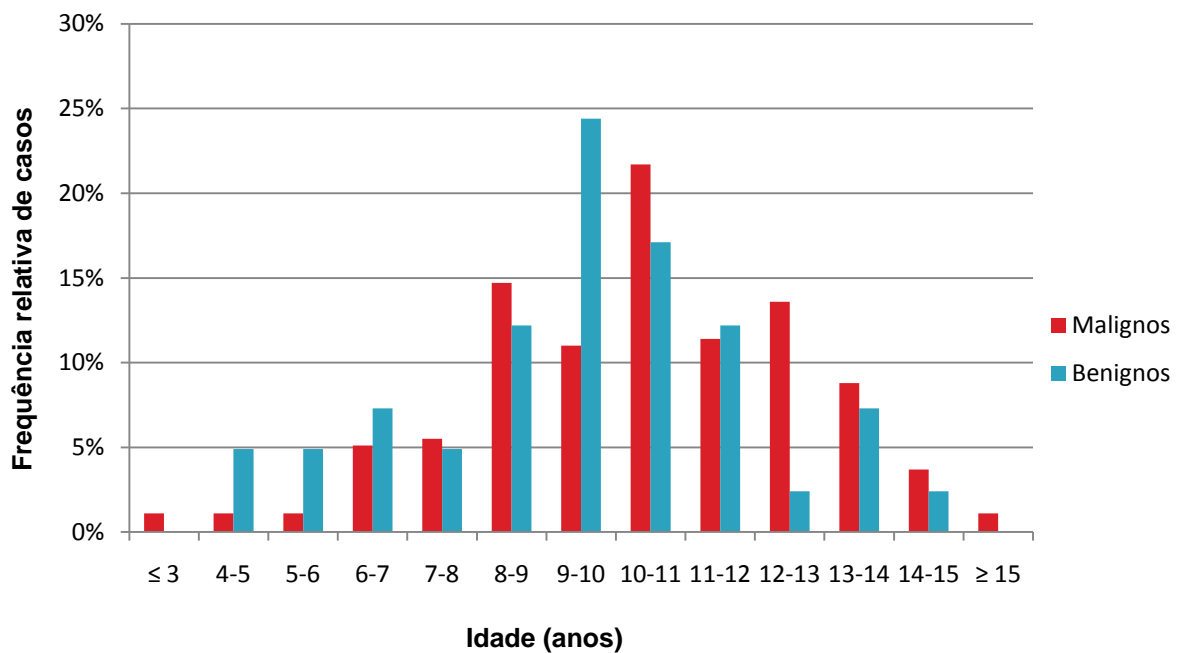
**Gráfico 5.** Distribuição dos tumores mamários malignos e benignos nos canídeos.

### 3.2.1.2. Distribuição e caracterização etárias dos cães com tumores malignos e benignos.

Na presente análise verificou-se que a idade a que os canídeos apresentavam neoplasias benignas variava entre valores mais restritos, quando comparada com a faixa etária a que os animais possuíam tumores malignos. Assim sendo, o valor mínimo e máximo de idade observados nos casos correspondentes a tumores benignos era de 4 e 14, respectivamente, ao passo que a faixa etária dos indivíduos afectados por neoplasias malignas variou entre os 2 e os 16 anos. Provavelmente, tal aspecto deve-se ao facto do número de cães, com idade conhecida, afectados por processo tumoral benigno ser inferior aos que apresentavam neoplasias malignas e que possuíam também informação respeitante à idade. No entanto, pode concluir-se que os animais tendiam a apresentar patologia tumoral maligna a uma idade um pouco mais avançada aquando da comparação com os outros pacientes, na medida em que a média de idades dos primeiros era de 9,9, em oposição aos 9 verificados nas situações de tumor benigno. Se se tiver em conta o Intervalo de Confiança (95%) (IC (95%)), verifica-se que 95% dos casos correspondentes a tumores benignos encontravam-se situados aproximadamente entre os 4 e os 14 anos, ao passo que a mesma percentagem de animais com tumores malignos tinha uma idade compreendida entre 5 e 15 anos. Constatou-se que, era aos 10 e 9 anos que se observavam a maioria dos casos correspondentes a neoplasias malignas e benignas, respectivamente. O teste de Qui-quadrado realizado permitiu concluir que o facto de o tumor ser benigno ou maligno depende da idade dos animais afectados ( $p \leq 0,05$ ) (anexo I, tabelas 1.1). É necessário ter em conta que do total de casos associados a tumores malignos e benignos, 27 e 7 tinham idade desconhecida, respectivamente, não tendo estes sido considerados na obtenção dos

resultados. Sendo assim, a amostra era constituída apenas por 313 dos 347 casos correspondentes à divisão tumor benigno/maligno. O gráfico 6 e a tabela 9 representam a distribuição e caracterização etárias dos canídeos com tumores mamários malignos e benignos.

**Gráfico 6.** Distribuição etária dos canídeos com tumores mamários malignos e benignos.



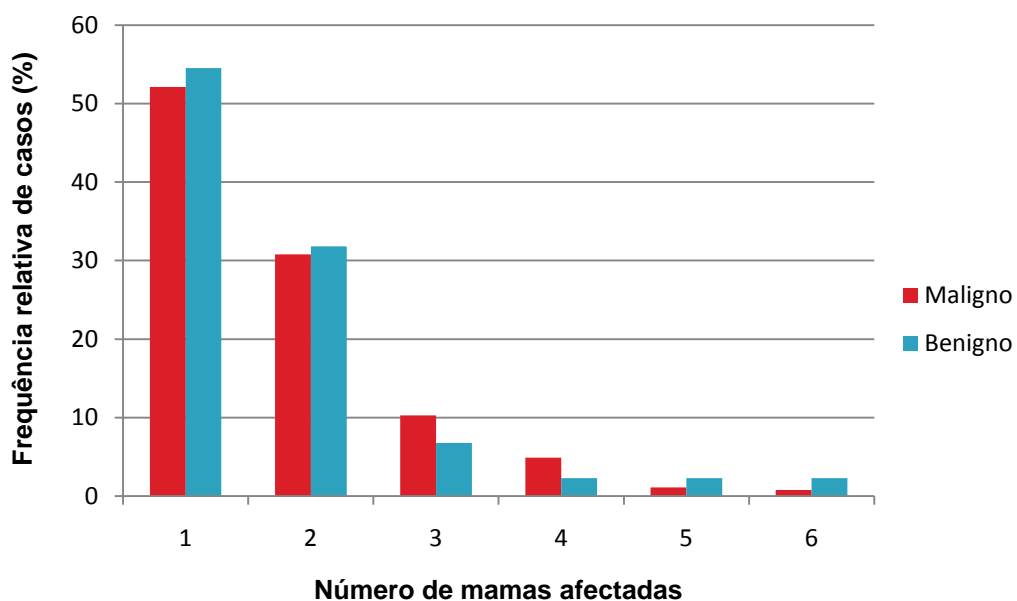
**Tabela 9.** Caracterização etária dos canídeos com tumores mamários malignos e benignos.

Idade	Benignos	Malignos
Mínimo	4	2
Máximo	14	16
Média	9	9,9
Moda	9	10
Mediana	9	10
Desvio-padrão	2,4	2,4
IC (95%)	4,2-13,8	5,1-14,7
Total casos com idade conhecida	41	272

### 3.2.1.3. Avaliação do número de mamas afectadas por tumores benignos e malignos, nos canídeos.

Da observação do gráfico 7 conclui-se que, na espécie canina, a maior parte dos casos correspondentes a tumores mamários malignos e benignos apresentava apenas uma glândula mamária afectada pelo processo tumoral (137 casos; 52,1% e 24 tumores; 54,5%, respectivamente). Também se observou uma maior frequência relativa de tumores benignos a envolverem apenas 1 ou 2 mamas, comparativamente aos malignos. Contrariamente, tendo em conta o desenvolvimento tumoral em 3 ou 4 glândulas mamárias, verificou-se uma predominância das neoplasias malignas (10,3%; 27 casos e 4,9%; 13 casos, respectivamente) relativamente aos tumores benignos (6,8%; 3 tumores e 2,3%; 1 tumor). Porém, a taxa de incidência de tumores a desenvolverem-se em 5 ou 6 mamas é superior no que diz respeito às neoplasias benignas (2,3% em ambas as situações), comparativamente às malignas (1,1%; 3 casos na primeira situação e 0,8%; 2 casos na segunda). No entanto, segundo o resultado do teste de Qui-quadrado realizado, o número de mamas afectadas é independente do facto do tumor ser maligno ou benigno ( $p \geq 0,05$ ) (anexo I, tabelas 1.3). Nesta análise apenas se considerou a divisão tumor benigno/maligno. Assim sendo, foram analisados 263 e 44 casos de tumores mamários malignos e benignos, respectivamente, uma vez que em 40 não havia informação acerca do número de mamas afectadas. Como tal, a amostra era constituída por 307 casos.

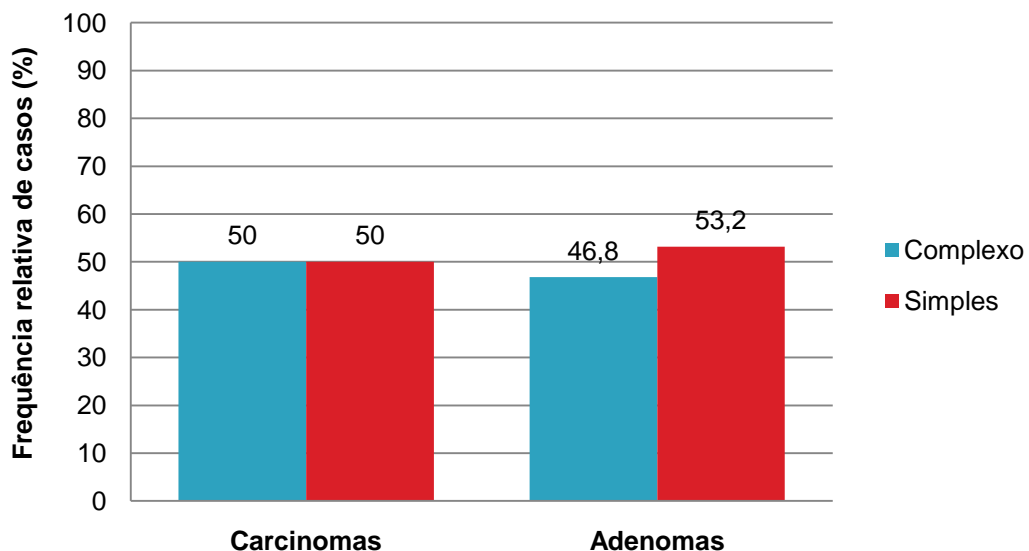
**Gráfico 7.** Avaliação do número de mamas afectadas por tumores mamários malignos e benignos, nos canídeos.

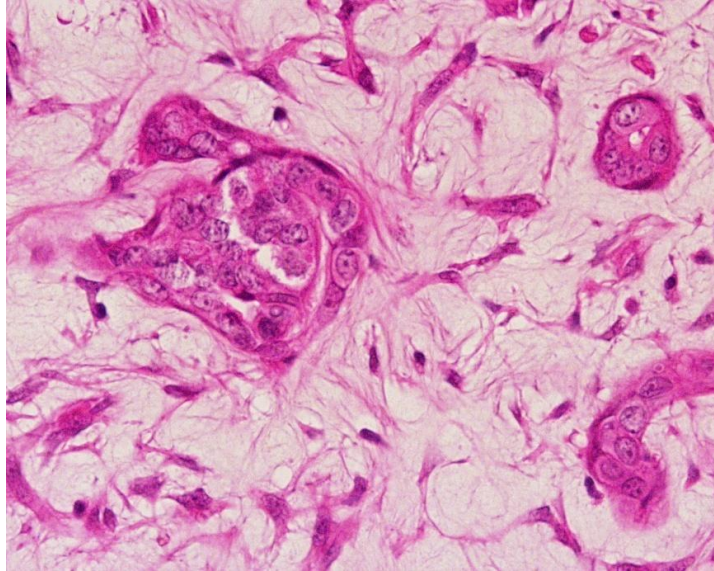


### 3.2.1.4. Classificação dos tumores mamários malignos e benignos em complexo/simples.

Na presente análise foi considerada a subdivisão dos carcinomas e adenomas em complexo e simples. Verificou-se que nos adenomas há uma ligeira predominância do tipo simples (53,2%; 25 casos) relativamente ao complexo (46,8%; 22 tumores), ao passo que nos carcinomas obteve-se uma frequência relativa igual de casos de tumores simples e complexos (figura 8). Segundo o resultado do teste de Qui-quadrado realizado, a classificação complexo/simples é independente do facto do tumor ser benigno ou maligno ( $p \geq 0,05$ ) (anexo I, tabelas 1.6). Para a obtenção destes resultados, do total de 331 neoplasias malignas foram analisadas 326, na medida em que 4 dos tumores malignos pertenciam aos tipos especiais de carcinoma, os quais foram excluídos, e um era um condrossarcoma. No que diz respeito aos tumores benignos, consideraram-se 47 do total de 48 tumores, uma vez que um deles era do tipo osteocondroma. Sendo assim, nesta análise foi tida em consideração a divisão tumor benigno/maligno e tumor maligno/maligno. O gráfico 8 é representativo da distribuição dos carcinomas e adenomas consoante a classificação em complexo e simples.

**Gráfico 8.** Classificação dos carcinomas e adenomas mamários em complexo/simples

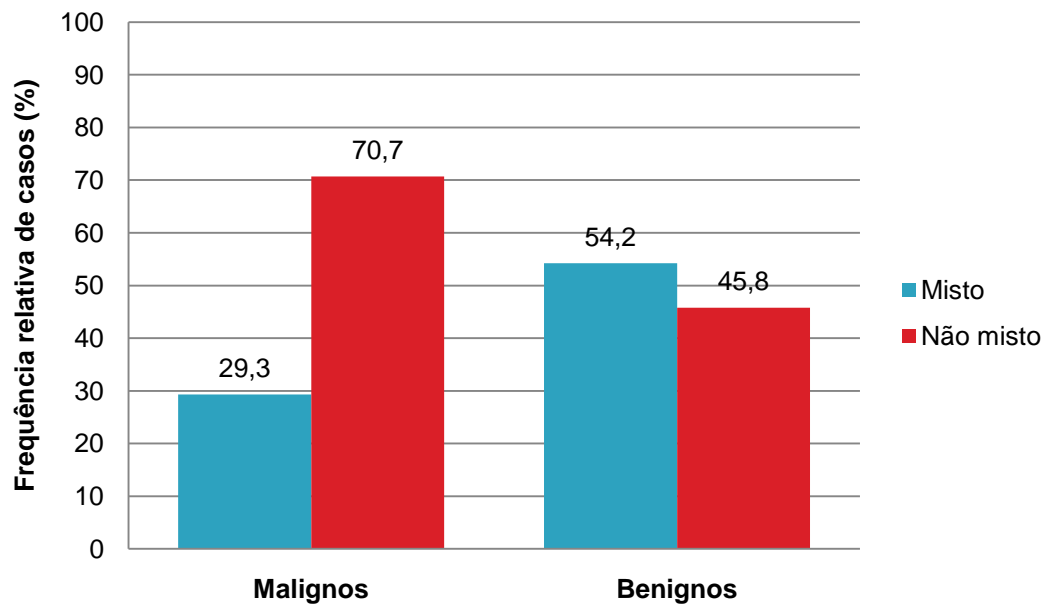
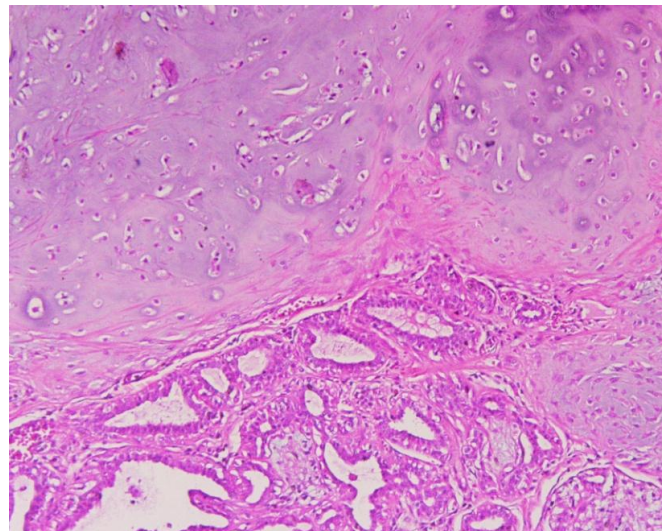


**Figura 8.** Carcinoma mamário complexo (original).

Carcinoma mamário complexo de tipo túbulo-papilífero de grau I de malignidade. Na figura pode observar-se a presença tanto do componente epitelial luminal como do meiepitelial. Canídeo, Caniche, 10 anos, fêmea inteira. 400X, H&E.

#### 3.2.1.5. Classificação dos tumores malignos e benignos em misto/não misto.

Na presente análise foi utilizada a seguinte classificação dos tumores mamários: misto (com componente epitelial e mesenquimatosa) e não misto (apenas com uma das componentes). Concluiu-se que, enquanto a grande maioria dos tumores malignos pertencia à classificação de não misto (234 casos; 70,7%), o oposto verificou-se no caso dos processos tumorais benignos. Assim sendo, foram observados 26 tumores benignos mistos (54,2%) (figura 9), ao passo que os não mistos correspondiam a 22 casos (45,8%). O teste de Qui-quadrado permitiu comprovar a dependência entre a classificação misto/não misto e o facto de o tumor ser maligno ou benigno ( $p \leq 0,05$ ) (anexo I, tabelas 1.2). A amostra utilizada para a obtenção destes resultados correspondeu às 379 neoplasias observadas (331 tumores malignos e 48 benignos), sendo que todos os casos dispunham de informação quanto ao parâmetro analisado. O gráfico 9 apresenta a distribuição dos tumores malignos e benignos consoante a classificação em misto/não misto.

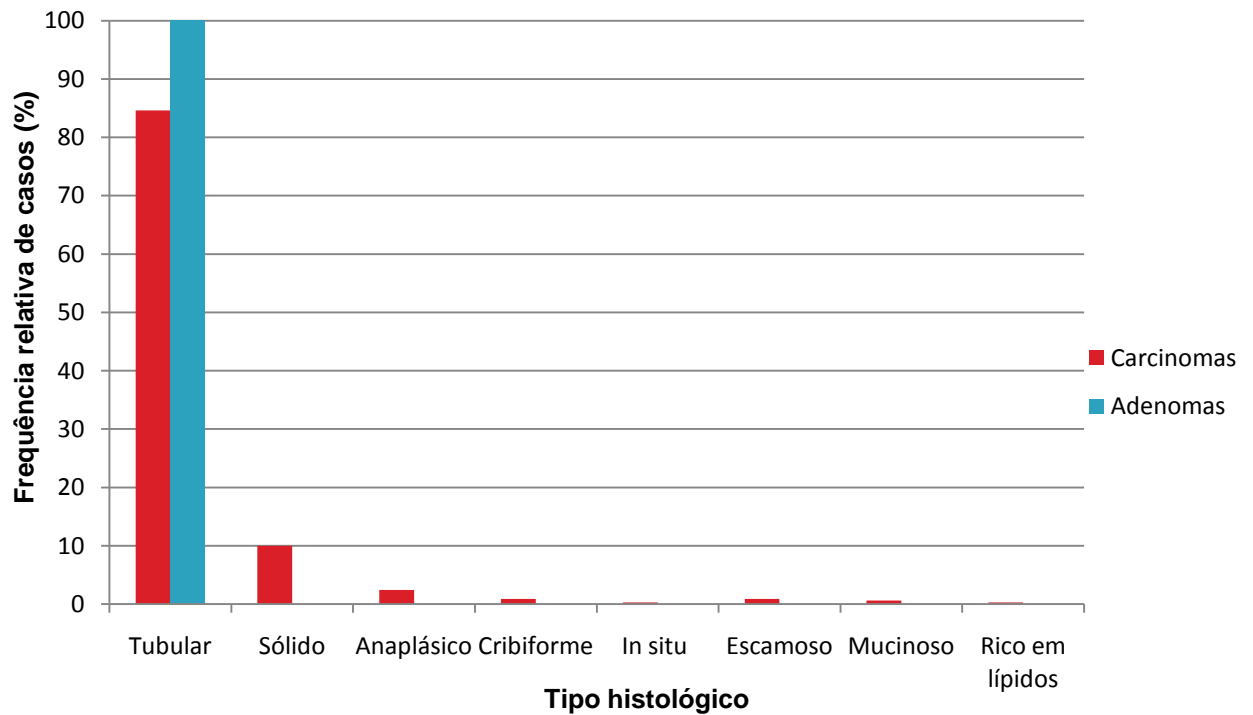
**Gráfico 9.** Classificação dos tumores mamários malignos e benignos em misto/não misto.**Figura 9.** Tumor benigno misto (original)

Adenoma de tipo túbulo-papilífero com zonas de diferenciação cartilágnea. Na figura pode observar-se a presença de células epiteliais dispostas segundo um padrão túbulo-papilífero e de células mesenquimatosas. É também visível a produção de cartilagem por parte destas últimas. Canídeo, Caniche, 8 anos, fêmea inteira. 100X, H&E.

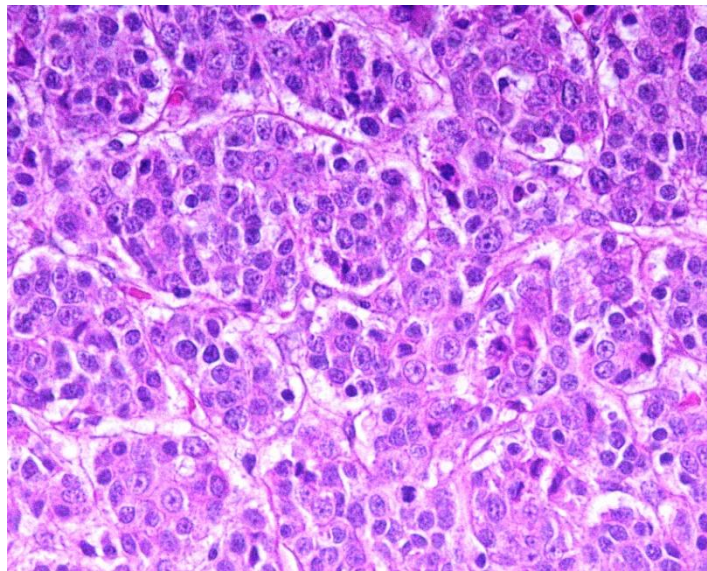
### 3.2.1.6. Caracterização dos tumores malignos e benignos quanto ao tipo histológico.

A presente análise teve como objectivo caracterizar a distribuição dos carcinomas e adenomas mamários da espécie canina quanto ao tipo histológico, excluindo para o efeito os tumores de origem mesenquimatosa. Sendo assim, do total de 331 neoplasias mamárias malignas 330 foram utilizadas como amostra, tendo-se posto de parte um dos tumores, na medida em que este era do tipo condrossarcoma. No que diz respeito às neoplasias benignas, foram analisados 47 dos 48 tumores benignos, uma vez que um dos casos correspondia a uma neoplasia benigna do tipo osteocondroma. Da observação do gráfico 10, pode-se verificar um grande predomínio de carcinomas do tipo histológico tubular (279 casos, 84,6%), seguindo-se o tipo sólido (33 casos, 10%) (figura 10) com uma grande diferença percentual relativamente ao primeiro. O terceiro e quarto tipos de carcinoma mais frequentes eram o anaplásico (8 tumores, 2,4%) e o cribiforme (3 casos, 0,9%), respectivamente. Com frequências relativas mais baixas observou-se os tipos especiais de carcinoma, os quais englobavam o tipo escamoso (figura 11), mucinoso e rico em lípidos, por ordem decrescente de taxa de incidência, que correspondiam a um total de 1,8% dos casos. Tal como o carcinoma rico em lípidos, também apenas um caso (0,3%) apresentava o tipo carcinoma *in situ* (figura 12). Tendo em conta os adenomas, conclui-se que a totalidade destes pertencia ao tipo tubular (figura 13), observando-se um maior número de tumores benignos associados a este tipo histológico comparativamente aos malignos.

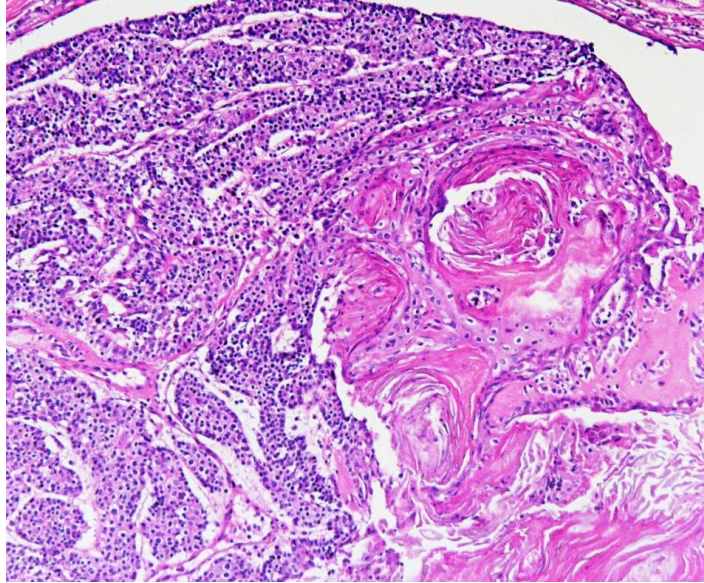
**Gráfico 10.** Distribuição dos adenomas e carcinomas mamários em função do tipo histológico, nos canídeos.



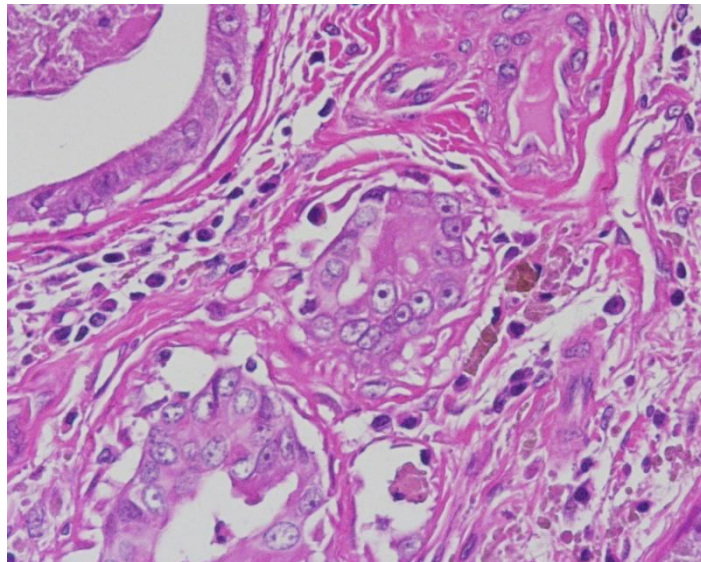
**Figura 10.** Carcinoma de tipo sólido (original).



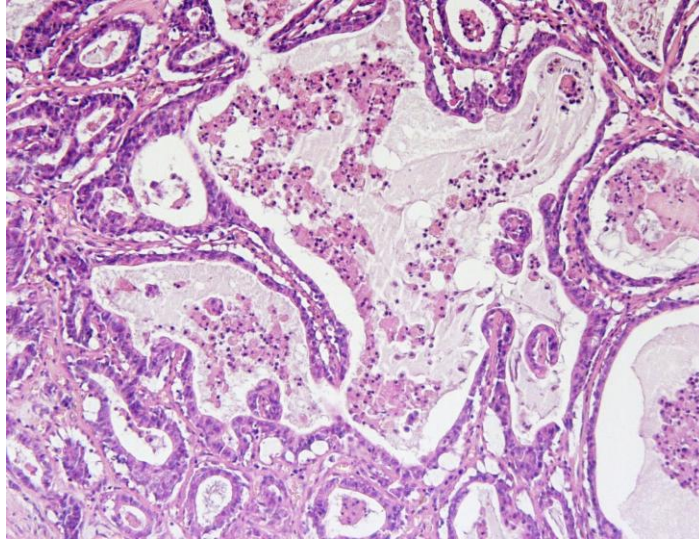
Carcinoma mamário simples de tipo sólido de grau III de malignidade. Na figura é visível a disposição das células tumorais em «ninhos» sólidos. É de notar a anisocariose intensa característica do grau III de malignidade. Canídeo, Chavalier King Charles, 9 anos, fêmea ovariectomizada. 400X, H&E.

**Figura 11.** Carcinoma de tipo escamoso (original).

Carcinoma de tipo escamoso de grau III de malignidade. Na figura é visível a disposição das células tumorais em «cordões» sólidos a envolverem áreas de diferenciação escamosa, as quais contêm queratina lamelar. Canídeo, Boxer, 12 anos, fêmea inteira. 100X, H&E.

**Figura 12.** Carcinoma *in situ* (original).

Carcinoma mamário *in situ*. Na figura pode verificar-se a ausência de invasão, por parte das células neoplásicas, das membranas basais dos túbulos pré-existent. Canídeo, Pequinois, 11 anos, fêmea inteira. 400X, H&E.

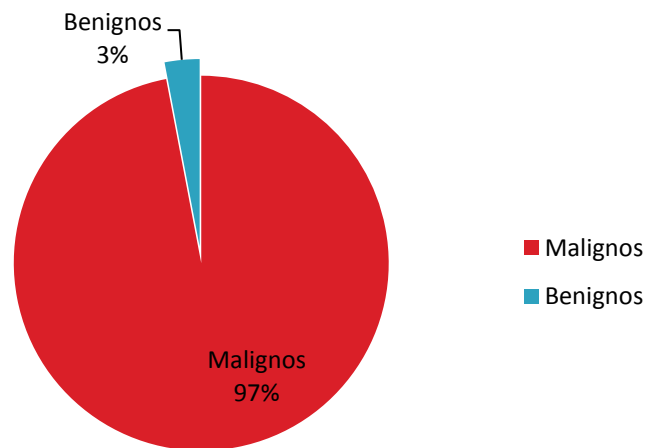
**Figura 13.** Adenoma de tipo túbulo-papilífero (original).

Adenoma mamário simples de tipo túbulo-papilífero. Na figura é possível observar a presença dum epitélio luminal hiperplásico com um número reduzido de atipias celulares. No lúmen dos ductos intralobulares observa-se a existência dum material amorfo com alguma celularidade. Canídeo, Teckel, 9 anos, fêmea inteira. 100X, H&E.

### 3.2.2. Felídeos

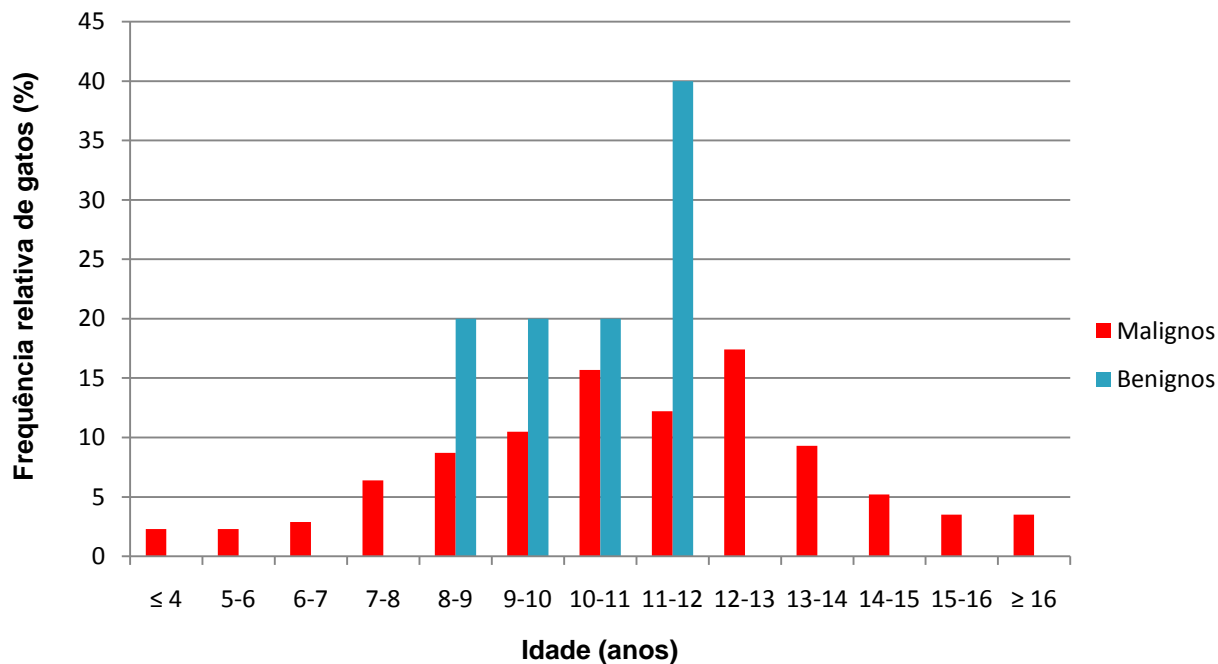
#### 3.2.2.1. Distribuição dos tumores malignos e benignos nos felídeos.

Nesta análise considerou-se, como amostra, os 197 casos correspondentes ao total de neoplasias benignas e malignas, tendo-se excluído todos os outros processos patológicos presentes nas glândulas mamárias. Tendo em conta os resultados obtidos, verificou-se que 191 casos (97%) eram neoplasias malignas, ao passo que os tumores benignos correspondiam a apenas 3% (6 neoplasias) do total de patologia tumoral mamária. O gráfico 11 apresenta a distribuição dos tumores benignos e malignos nos gatos.

**Gráfico 11.** Distribuição dos tumores mamários benignos e malignos nos felídeos.

### 3.2.2.2. Distribuição e caracterização etárias dos gatos com tumores benignos e malignos.

Nesta análise verificou-se que o intervalo correspondente à faixa etária associada aos tumores benignos era muito restrito, comparativamente com os malignos. Provavelmente tal aspecto deve-se ao facto do número de gatos, com idade conhecida, afectados por processo tumoral benigno ser muito baixo (apenas 5 casos), em oposição aos que apresentavam neoplasias malignas e que possuíam também informação respeitante à idade. Assim sendo, os valores mínimo e máximo de idade observados nos casos correspondentes a tumores benignos eram de 8 e 11 anos, respectivamente, ao passo que a faixa etária dos indivíduos afectados por neoplasias malignas variou entre os 3 e os 19 anos. Também é notório o facto de 95% dos casos correspondentes a patologia tumoral benigna encontrarem-se aproximadamente entre os 7 e os 12 anos, enquanto a mesma percentagem de gatos mas com neoplasias malignas possuía idades aproximadas entre os 5 e os 16 anos. No entanto, verificou-se que, tal como nos cães, também a média de idades e o valor de idade a que correspondia um maior número de casos era superior nos animais com tumores malignos, relativamente aos que apresentavam processo tumoral benigno. Como se pode verificar através do gráfico 12 e da tabela 10, que representam a distribuição e caracterização etárias dos felinos afectados por patologia tumoral, o valor médio de idades no caso dos tumores malignos era de 10,5 anos, sendo que a maior parte dos animais tinha 12 anos. No que diz respeito aos tumores benignos, estes valores correspondiam a 9,8 e 11 anos, respectivamente. Segundo o resultado do teste de Qui-quadrado realizado, a idade e o facto de o tumor ser maligno ou benigno são independentes ( $p \geq 0,05$ ) (anexo I, tabelas 2.1). A amostra utilizada para a obtenção dos resultados foi de 177 casos (dos 191 gatos com tumores mamários), uma vez que em 14 a idade era desconhecida.

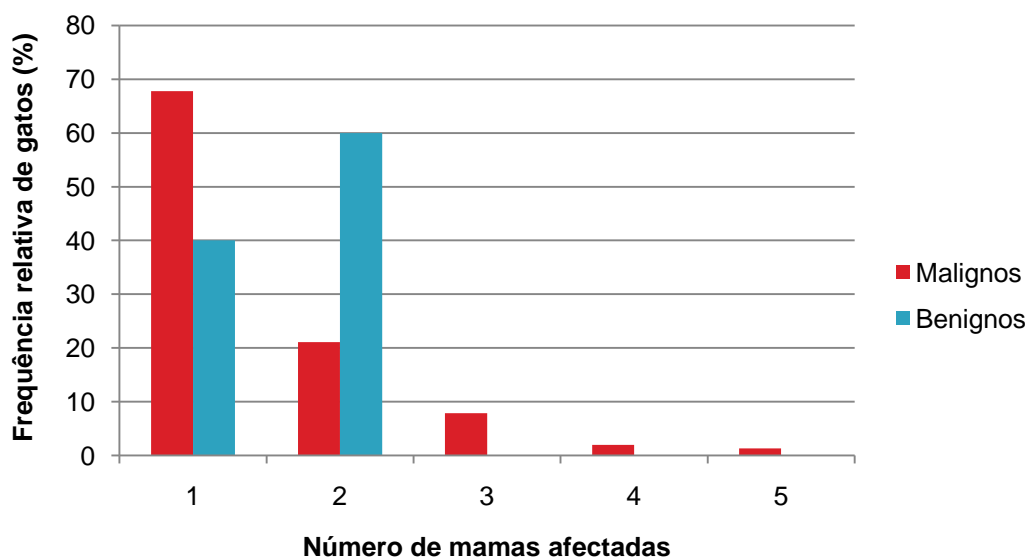
**Gráfico 12.** Distribuição etária dos gatos com tumores mamários benignos e malignos.**Tabela 10.** Caracterização etária dos gatos com tumores mamários malignos e benignos.

Idade (anos)	Benignos	Malignos
Mínimo	8	3
Máximo	11	19
Média	9,8	10,5
Moda	11	12
Mediana	10	11
Desvio-padrão	1,3	2,81
IC (95%)	7,2-12,4	4,9-16,1
Total de casos com idade conhecida	5	172

### 3.2.2.3. Avaliação do número de mamas afectadas por tumores benignos e malignos, nos felídeos.

Da observação do gráfico 13, pode concluir-se que há um predomínio de gatos com tumores malignos e benignos a apresentarem um baixo número de glândulas mamárias afectadas, relativamente aos que possuíam uma maior quantidade de mamas envolvidas no processo tumoral. Assim sendo, tendo em conta 157 animais dos 191 com neoplasias, os quais continham informação acerca do número de mamas lesionadas, 105 (66,9%), ou seja a maioria, apresentava apenas uma glândula mamária afectada. No que diz respeito aos tumores benignos, todos eles envolviam apenas 1 (2 casos, 40%) ou 2 (3 animais, 60%) mamas, ao passo que os casos associados a 3, 4 ou 5 glândulas mamárias afectadas correspondiam apenas a tumores malignos, embora a taxa de incidência destes últimos diminuísse progressivamente à medida que o número de mamas aumentava (12 felinos; 7,9%, 3 casos; 2% e 2 gatos; 1,3%, respectivamente). Outro aspecto notório, consiste no facto de a frequência absoluta e relativa de neoplasias a envolverem apenas uma mama ser superior no caso dos tumores malignos comparativamente aos benignos (103 casos; 67,8% face a 2 animais; 40%). No entanto, observou-se uma maior taxa de incidência de processo tumoral benigno localizado em duas glândulas mamárias, relativamente à encontrada nas neoplasias malignas (3 casos; 60% e 32 felinos; 21,1%, respectivamente). Porém, segundo o resultado do teste de Qui-quadrado realizado, o número de mamas afectadas é independente do facto do tumor ser maligno ou benigno ( $p \geq 0,05$ ) (anexo I, tabelas 2.3).

**Gráfico 13.** Avaliação do número de mamas afectadas por tumores mamários malignos e benignos, nos gatos.



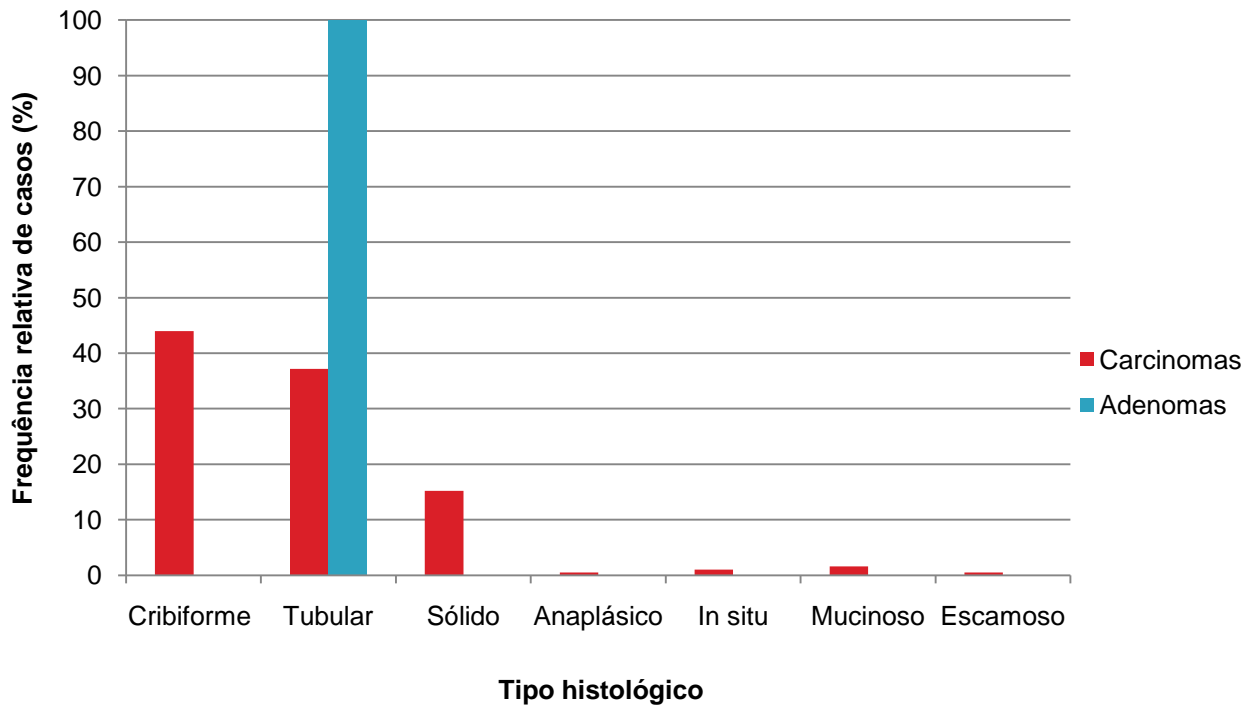
#### 3.2.2.4. Classificação dos tumores malignos e benignos em misto/não misto.

Considerando, como amostra, as 197 neoplasias mamárias observadas na espécie felina (191 tumores malignos e 6 benignos), verificou-se que apenas 5 (2,6%) comportavam a designação de tumores mistos, os quais correspondiam, na sua totalidade, a neoplasias malignas. Como tal, a maioria dos tumores pertencia ao grupo dos não mistos (192 casos; 97,4%). Com base no resultado do teste de Qui-quadrado, a classificação misto/não misto é independente do facto de o tumor ser benigno ou maligno ( $p \geq 0,05$ ) (anexo I, tabelas 2.2).

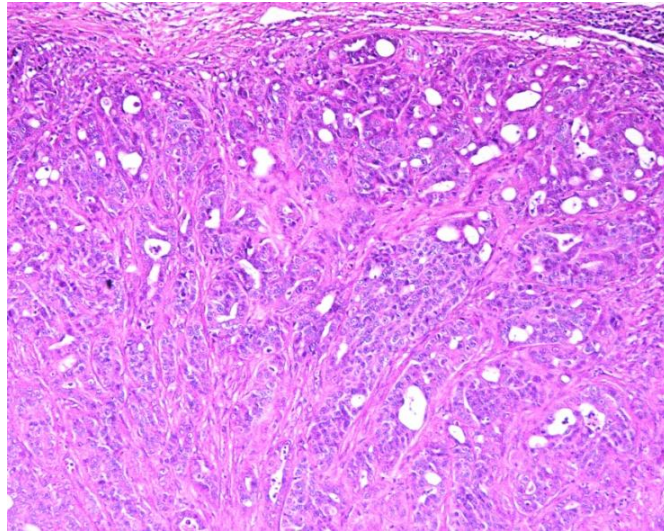
#### 3.2.2.5. Caracterização dos tumores malignos e benignos quanto ao tipo histológico.

Aquando da avaliação dos carcinomas mamários consoante o tipo histológico, verificou-se que o tipo predominante era o cribiforme (84 casos; 44%) (figura 14), seguido do tubular (71 tumores; 37,2%) (figura 15) e do sólido (29 casos; 15,2%). Por último, com taxas de incidência inferiores obteve-se, por ordem decrescente, o conjunto dos tipos especiais de carcinoma (4 tumores; 2,1%), em que o carcinoma mucinoso (figura 16) era o que se encontrava associado a uma maior percentagem de tumores (3 casos; 1,6%), os carcinomas *in situ* (2 casos; 1%) e os anaplásicos (1 caso; 0,5%) (figura 17). No que diz respeito aos adenomas, verificou-se que a totalidade destes tumores pertencia ao tipo tubular. A amostra utilizada nesta análise consistiu nas 191 neoplasias mamárias malignas e em 4 dos 6 tumores benignos (2 eram de origem mesenquimatosa, do tipo fibroadenoma, tendo então sido excluídos). O gráfico 14 é representativo dos aspectos acima descritos.

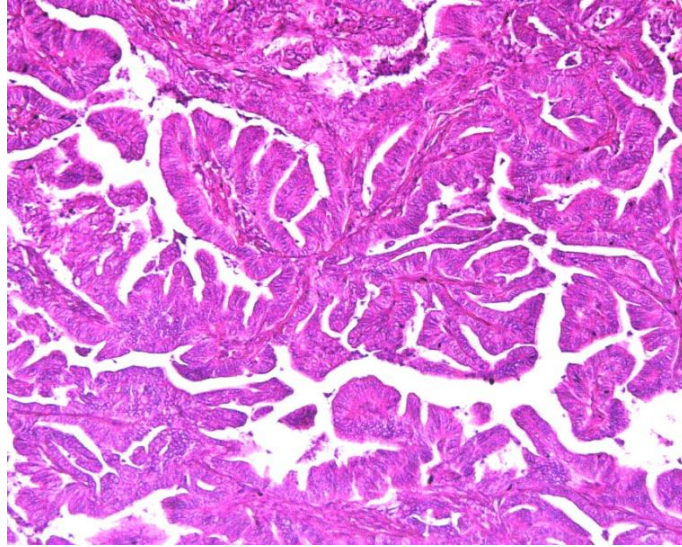
**Gráfico 14.** Distribuição dos carcinomas e adenomas mamários em função do tipo histológico, nos gatos.



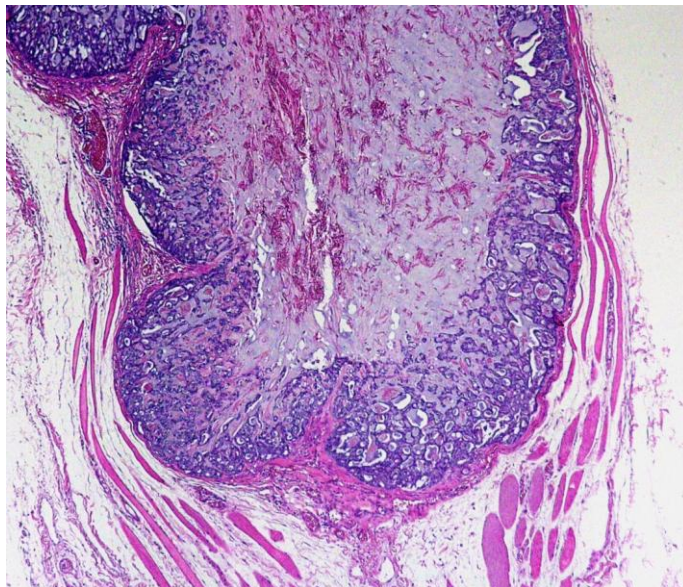
**Figura 14.** Carcinoma de tipo cribiforme (original).



Carcinoma mamário de tipo cribiforme, de grau III de malignidade. Na figura é visível a disposição das células tumorais segundo um padrão sólido, formando pequenas aberturas, as quais conferem ao tumor a aparência dum crivo. Felídeo, híbrida, 12 anos, fêmea inteira. 100X, H&E.

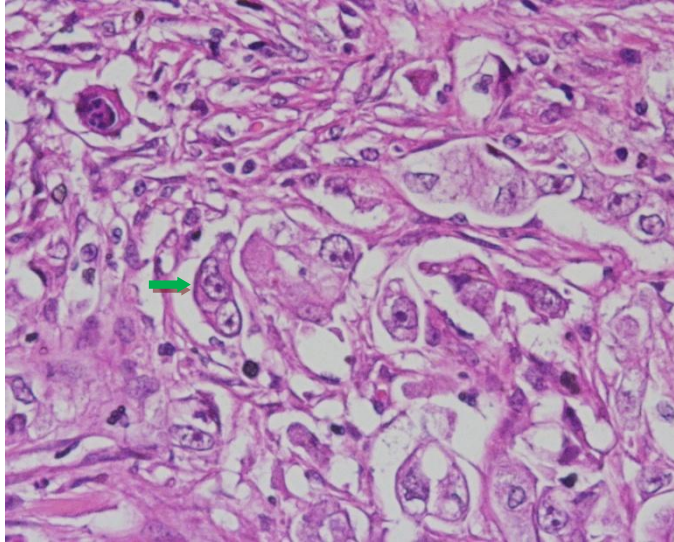
**Figura 15.** Carcinoma de tipo túbulo-papilífero (original)

Carcinoma mamário de tipo túbulo-papilífero de grau II de malignidade. Na figura observa-se a disposição das células tumorais em túbulos associados a projecções papilíferas. Felídeo, Europeu Comum, 13 anos, fêmea ovariectomizada. 100X, H&E.

**Figura 16.** Carcinoma de tipo mucinoso (original).

Carcinoma mamário de tipo mucinoso de grau III de malignidade. Na figura observa-se uma produção abundante de mucina, característica deste tipo tumoral. Felídeo, Europeu Comum, 12 anos. 40X, H&E.

**Figura 17.** Carcinoma de tipo anaplásico (original).



Carcinoma mamário de tipo anaplásico de grau III de malignidade. Na figura verifica-se a presença de células grandes, pleomórficas e com núcleos bizarros, as quais se encontram maioritariamente dispostas de forma isolada. Célula multinucleada (seta). Felídeo, Europeu Comum, 12 anos, fêmea inteira. 400X, H&E.

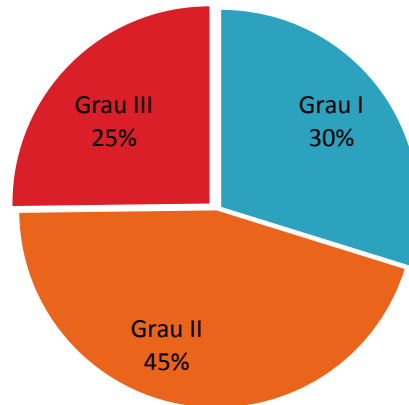
### 3.3. Tumores malignos

#### 3.3.1. Canídeos

##### 3.3.1.1. Avaliação dos graus de malignidade.

Aquando da avaliação dos graus de malignidade dos carcinomas mamários da espécie canina, verificou-se um predomínio do grau II (148 casos, 45%), seguido do grau I (98 tumores, 30%). O grau III era o que apresentava uma menor taxa de incidência (83 casos, 25%). A amostra era constituída por 329 do total de 331 tumores malignos, na medida em que dois dos tumores eram dos tipos condrossarcoma (não tendo sido englobados nesta análise os tumores de origem mesenquimatosa) e carcinoma *in situ*. O gráfico 15 representa a caracterização dos graus de malignidade.

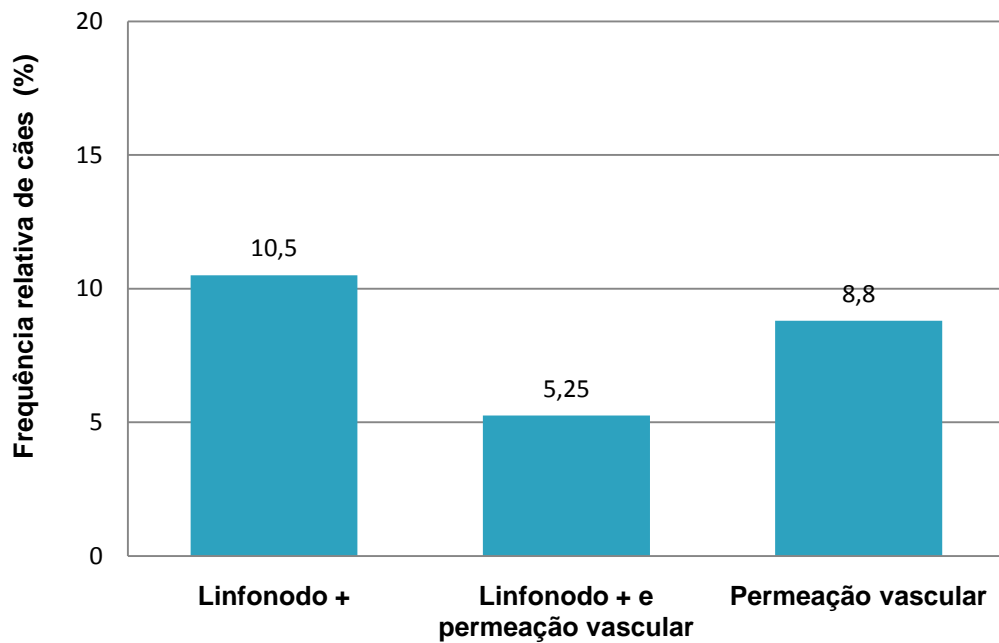
**Gráfico 15.** Caracterização dos graus de malignidade dos carcinomas mamários, nos canídeos.



### 3.3.1.2. Comparação entre a existência ou ausência de metástases nos linfonodos e a observação de permeação vascular.

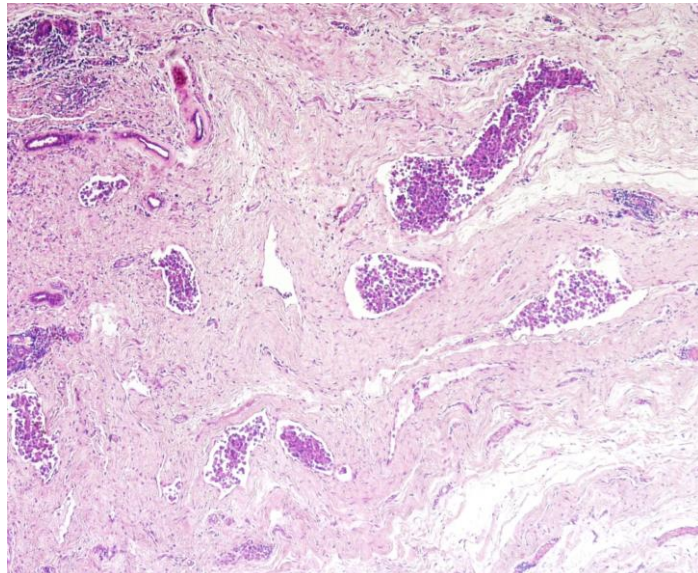
Na presente análise foram considerados como amostra 171 casos, que correspondiam aos cães com tumores mamários malignos de natureza invasiva, em que pelo menos um linfonodo regional foi caracterizado quanto à presença ou ausência de metástases. Sendo assim, em 128 canídeos (dos 299 com tumores mamários malignos) não foram examinados os linfonodos regionais, pelo facto de não terem sido recolhidos para exame histopatológico. Com os resultados obtidos, observou-se uma percentagem relativamente pequena de cães em que os linfonodos apresentavam metástases de tumor mamário (10,5%, 18 casos), correspondendo os restantes 89,5% (153 animais) a casos associados à ausência de metastização nos linfonodos. Aquando da análise dos pacientes que possuíam simultaneamente metástases nos linfonodos e permeação vascular ao nível do tumor primário, concluiu-se que estes correspondiam a apenas metade (5,25%, 9 casos) das situações em que os linfonodos se apresentavam afectados. Sendo assim, nos restantes 5,25% não foi observada a existência de permeação vascular apesar de já haver invasão dos linfonodos por células neoplásicas. Outro aspecto constatado, foi o facto de existirem casos com permeação vascular (figura 18), embora não tendo verificada a ocorrência de metástases nos linfonodos (3,5%; 6 animais). O gráfico 16 apresenta a comparação entre os parâmetros permeação vascular/metástases nos linfonodos regionais.

**Gráfico 16.** Comparação entre os parâmetros permeação vascular/metástases nos linfonodos regionais, nos canídeos.



Nota: Linfonodo + (positivo): Linfonodo com metástases

**Figura 18.** Permeação vascular por células neoplásicas (original).



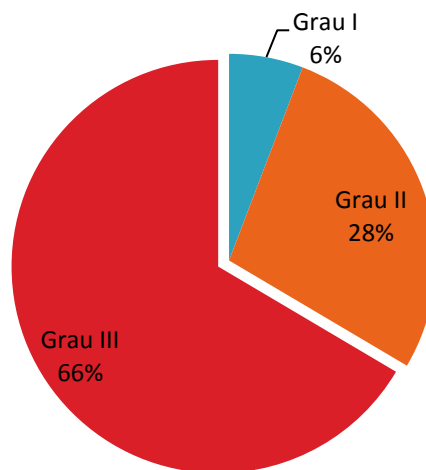
Carcinoma mamário simples de tipo anaplásico de grau III de malignidade. Na figura é visível a invasão de múltiplos vasos por células neoplásicas. Canídeo, Boxer, 8 anos, fêmea ovariectomizada. 40X, H&E.

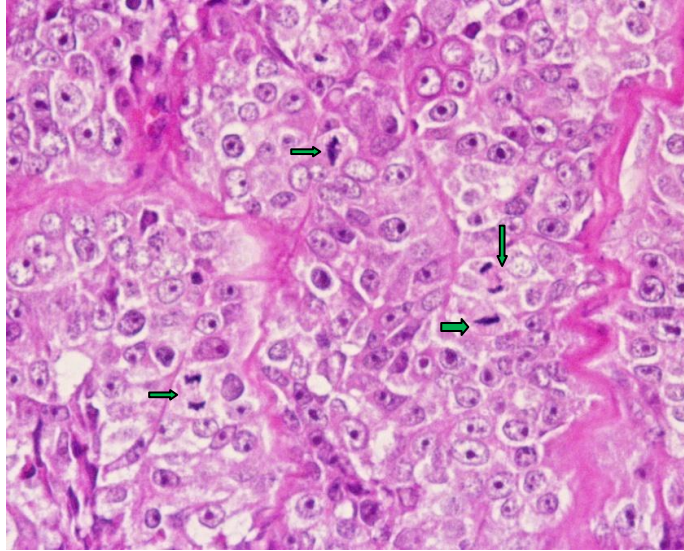
### 3.3.2. Felídeos

#### 3.3.2.1. Avaliação dos graus de malignidade

Na espécie felina, o grau de malignidade que correspondia à maioria dos tumores mamários malignos era o grau III (125 casos, 66%) (figura 19). Seguidamente, por ordem decrescente de taxa de incidência, tem-se o grau II (52 tumores, 28%) e o grau I (11 casos, 6%). A amostra era constituída por 188 dos 191 tumores malignos, na medida em que dois deles correspondiam a carcinomas *in situ* e o restante era um carcinoma tubular, a respeito do qual, devido a condições de fixação inadequadas, não foi possível determinar qual o grau de malignidade associado. O gráfico 17 é representativo dos aspectos acima descritos.

**Gráfico 17.** Caracterização dos graus de malignidade dos carcinomas mamários, nos felídeos.



**Figura 19.** Carcinoma de grau III de malignidade (original).

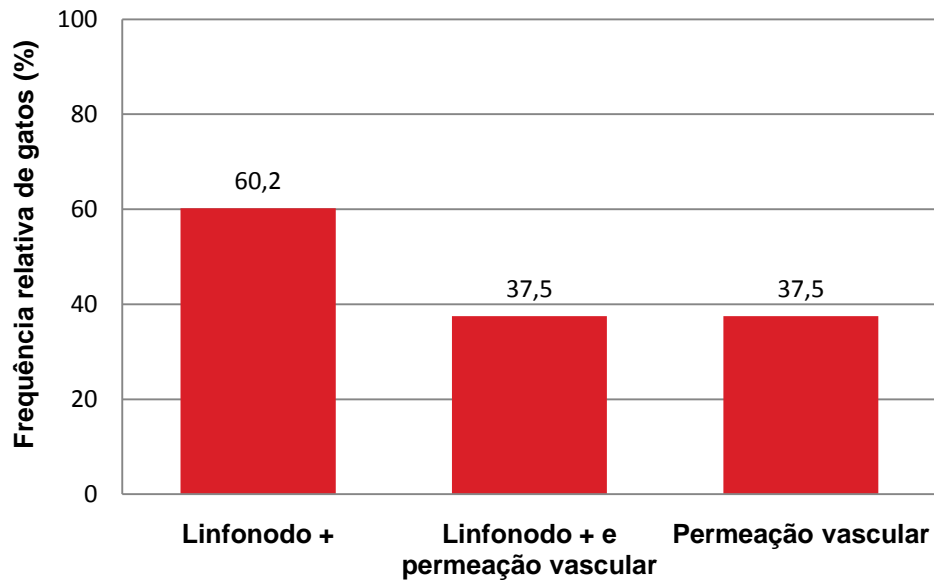
Carcinoma mamário de tipo sólido de grau III de malignidade. Na figura, as células apresentam anisocariose intensa e um elevado índice mitótico. Mitoses (setas). Felino, Europeu Comum, 11 anos, fêmea inteira. 400X, H&E.

### 3.3.2.2. Comparação entre a existência ou ausência de metástases nos linfonodos e a observação de permeação vascular.

Nesta análise foram considerados como amostra 88 casos, que correspondiam aos gatos com tumores mamários malignos de natureza invasiva, em que pelo menos um linfonodo foi caracterizado quanto à presença ou ausência de metástases. Sendo assim, em 95 gatos (dos 185 com tumores mamários malignos) não foram examinados os linfonodos regionais, pelo facto de não terem sido recolhidos para exame histopatológico. Os restantes dois casos, excluídos neste estudo, correspondiam a carcinomas *in situ*. Com os resultados obtidos, observou-se que, em mais de metade dos casos, os linfonodos apresentavam lesões de metástase de tumor mamário (60,2%; 53 casos) (figura 20), correspondendo os restantes 39,8% (35 animais) a casos associados à ausência de metastização. Aquando da análise das situações em que havia simultaneamente metástases nos linfonodos e permeação vascular ao nível do tumor primário, concluiu-se que estas correspondiam a mais de metade (37,5%; 33 casos) dos casos em que os linfonodos se apresentavam afectados. Sendo assim, nos restantes 20 animais (22,7%) não foi observada a existência de permeação vascular apesar de já haver invasão dos linfonodos por células neoplásicas. Os resultados obtidos evidenciaram também o facto de, em todos os casos em que havia permeação vascular, ter sido verificada simultaneamente a ocorrência de metastização nos

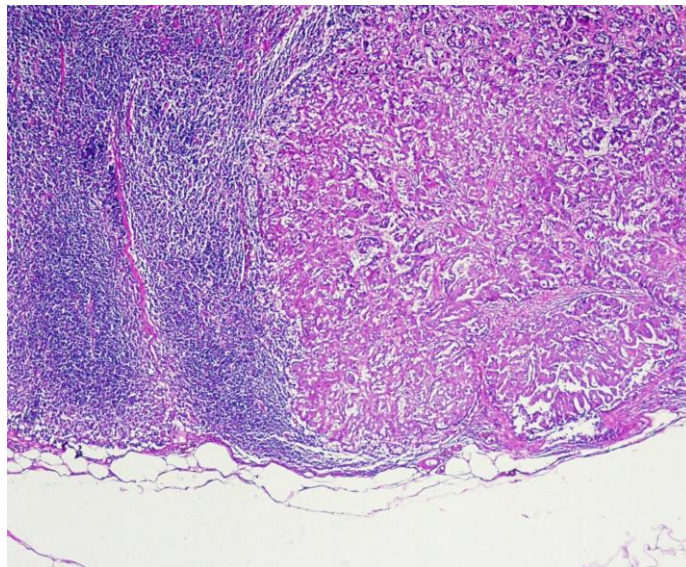
linfonodos. O gráfico 18 apresenta a comparação entre os parâmetros permeação vascular/metástases nos linfonodos regionais.

**Gráfico 18.** Comparação entre os parâmetros permeação vascular/metástases nos linfonodos regionais, nos felídeos.



Nota: Linfonodo + (positivo): linfonodo com metástases.

**Figura 20.** Metástase de carcinoma mamário num linfonodo (original).



Metástase, num linfonodo regional, de carcinoma mamário de tipo túbulo-papilífero de grau III de malignidade. Felino, Europeu Comum, 8 anos, fêmea ovariectomizada. 40X, H&E.

#### 4. Discussão

O estudo epidemiológico realizado teve como objectivo caracterizar a amostra populacional de canídeos e felídeos domésticos e realçar algumas características importantes dos tumores mamários. A análise efectuada incidiu sobre 588 animais (364 canídeos e 224 felídeos). Verificou-se que a maioria dos cães analisados apresentava neoplasias mamárias (327 canídeos, 89,8% dos animais estudados). Também nos gatos foi observada uma frequência relativa bastante elevada de animais com tumores mamários (85,3%). Tais resultados vão ao encontro do observado num estudo efectuado por Filho et al. (2010) em 1.647 lesões localizadas nas glândulas mamárias de cães, sendo que na referida análise verificou-se uma maior incidência de neoplasias mamárias face a outros processos patológicos analisados. Outro aspecto a realçar é o facto de, em ambas as espécies, haver uma maior taxa de incidência de neoplasias malignas relativamente às benignas, embora tal aspecto seja mais marcado no caso dos gatos (83% face a 3%). A maior quantidade de tumores malignos observados em comparação com os benignos pode dever-se a uma possível selecção, por parte dos clínicos veterinários, das neoplasias com características clínicas indicadoras de malignidade, para extirpação cirúrgica e posterior envio para análise histopatológica (Brodey et al., 1983; Peleteiro, 1994). Assim sendo, poderão ficar excluídas, em especial, algumas massas tumorais que, aquando do exame físico dos animais, apresentavam dimensões reduzidas (Peleteiro et al., 1996). Para além disso, tais massas poderão não ser alvo de atenção e de preocupação por parte dos donos.

Nos canídeos, a percentagem de tumores benignos era superior (11,5%) e a de tumores malignos ligeiramente inferior (79,6%), relativamente ao observado nos felinos. No entanto, no que diz respeito aos cães, a incidência de tumores mamários malignos revelou-se superior ao descrito por alguns autores, como por exemplo Rutteman et al. (2001), embora, como referido na revisão bibliográfica, esta possa ser bastante variável, podendo chegar aos 93% segundo Hashimoto et al. (2002). Peleteiro et al. (1996) e Filho et al. (2010) relataram taxas de incidência de neoplasias malignas próximas da obtida no presente estudo, as quais correspondiam a 85,6% e a 73,3%, respectivamente. Atendendo à patologia não tumoral mamária, verificou-se uma maior frequência relativa associada no caso dos gatos (13%), aquando da comparação com os cães (2,9%).

No que diz respeito à caracterização etária dos pacientes, observou-se que a média de idades a que os animais apresentavam tumores mamários era ligeiramente superior no caso dos felinos (10,5 anos), em relação ao valor encontrado para os canídeos (9,8 anos). Tal facto é também evidenciado pelos autores citados na revisão bibliográfica. Também a idade a que correspondia um maior número de animais era maior na espécie felina (12 anos), comparativamente à canina (10 anos). No presente estudo, também se verificou que a

média de idades correspondente aos cães que apresentavam neoplasias malignas era superior à dos animais que possuíam tumores benignos (9,9 anos face a 9 anos), obtendo-se um resultado semelhante para o caso dos gatos (10,5 anos face a 9,8 anos). Tal facto corrobora com os resultados obtidos por Filho et al. (2010).

Aquando da avaliação das fêmeas inteiras e ovariectomizadas, verificou-se que não existia uma diferença significativa entre estas, no que diz respeito à taxa de incidência tumoral. Tal conclusão foi reforçada aquando da realização do teste de Qui-quadrado, segundo o qual o facto de surgirem tumores mamários benignos ou malignos ou outras lesões (anexo I, tabelas 1.5 e 2.5) é independente do estado hormonal das fêmeas (anexo I, tabelas 1.4 e 2.4). Assim sendo, o efeito protector associado à ovariectomia pode, na generalidade dos casos, não se ter feito sentir devido às cadelas e gatas poderem ter sido sujeitas a tal procedimento cirúrgico após o segundo cio, contrariando o descrito por Rutteman et al. (2001), segundo o qual, mesmo em cadelas ovariectomizadas tardiamente, existe uma diminuição da frequência relativa de tumores mamários benignos.

Na avaliação feita a propósito das raças de cães, verificou-se que a raça Caniche, Cocker e Yorkshire Terrier eram, por ordem decrescente, as que possuíam uma maior taxa de incidência de tumores mamários. Para verificar se a maior frequência relativa de animais com tumores mamários pertencentes a estas raças pode ser explicada pelo facto de existir um maior número de efectivos registados associados às mesmas, recorreu-se aos registos oficiais do Clube Português de Canicultura correspondentes ao ano de 2009. Segundo estes, encontram-se descritas como sendo mais comuns em Portugal durante este ano, as raças Retriever do Labrador, Pastor Alemão, Yorkshire Terrier, Golden Retriever, Pinscher Miniatura, Chihuahua, Rottweiler, Serra da Estrela e Podengo Português, por ordem decrescente. Convém ainda considerar que a Cocker está entre as vinte e uma raças com maior número de animais registados (anexo IV). Assim sendo, o facto da Cocker e da Yorkshire surgirem como duas das três raças com maior frequência relativa de tumores pode dever-se, em parte, a estarem entre as mais frequentes no efectivo total português registado. No entanto, alguns autores citados na revisão bibliográfica, entre os quais Rutteman et al. (2001), também encontraram uma maior incidência de tumores nas raças Cocker e Caniche. Quanto às raças felinas, verificou-se que as associadas a uma maior percentagem de animais com tumores mamários eram a Europeu Comum, a Persa e a Siamesa, por ordem decrescente. Tal como para as raças caninas, tais resultados podem dever-se a uma maior frequência destas na população felina, embora Rutteman et al. (2001) tenham afirmado a existência duma maior predisposição da raça Siamesa para o desenvolvimento de neoplasias mamárias. Concluiu-se então que os resultados obtidos não permitem afirmar que existe uma predisposição rácica, tanto no cão como no gato, na medida em que o maior aparecimento de certas raças com estes tumores pode ser, em

parte, explicado pelo número de efectivos registados associados a estas. Para além disso, o presente estudo baseia-se numa amostra populacional que, apesar de significativa, é proveniente duma população desconhecida, não tendo sido estabelecida uma comparação entre as raças dos pacientes estudados e as associadas aos animais que constituíam essa população.

Tendo em conta a comparação entre tumores benignos e malignos, observou-se que tanto na espécie canina como felina, as neoplasias malignas surgiam, normalmente, a uma idade ligeiramente mais tardia, relativamente às benignas. Tal facto vai ao encontro do descrito por Brodey et al. (1983). Aquando da aplicação do teste Qui-quadrado, foi demonstrada a dependência entre a idade e o facto do tumor mamário ser maligno ou benigno ( $p \leq 0,05$ ), embora tal resultado só tenha sido obtido no caso dos canídeos (anexo I, tabelas 1.1 e 2.1).

No que diz respeito ao número de glândulas mamárias afectadas, foi aplicado o mesmo teste, segundo o qual o facto de o tumor se benigno ou maligno é independente do número de mamas ( $p \geq 0,05$ ) (anexo I, tabelas 1.3 e 2.3).

Na análise realizada em cães, de modo a relacionar a classificação complexo/simple com os casos correspondentes a tumores mamários malignos e benignos, obteve-se uma frequência relativa ligeiramente superior de adenomas simples, relativamente aos complexos (53,2% face a 46,8%), ao passo que os carcinomas complexos e simples apresentavam a mesma taxa de incidência. Estes resultados vão ao encontro do observado por Peleteiro et al. (1996), na medida em que estes autores verificaram um predomínio dos adenocarcinomas complexos. Segundo o teste de Qui-quadrado, esta classificação e o facto de o tumor ser maligno ou benigno são independentes ( $p \geq 0,05$ ) (anexo I, tabelas 1.6).

Também na espécie canina, verificou-se uma maior percentagem de tumores malignos não mistos (70,7%) relativamente aos mistos (29,3%), enquanto nas neoplasias benignas observou-se o contrário. Neste caso, o teste de Qui-quadrado permitiu inferir a existência duma dependência significativa entre esta classificação e o facto de o tumor ser benigno ou maligno ( $p \leq 0,05$ ) (anexo I, tabelas 1.2). Na espécie felina, considerando o total de neoplasias analisadas, observou-se uma percentagem muito reduzida de tumores mistos (2,6%), os quais correspondiam, na sua totalidade, a neoplasias malignas. No entanto, aplicando o mesmo teste que nos canídeos, verificou-se que a classificação do tumor em misto ou não misto é independente de ser benigno ou maligno ( $p \geq 0,05$ ) (anexo I, tabelas 2.2).

Aquando da caracterização dos adenomas e carcinomas quanto ao tipo histológico, concluiu-se que o tipo mais frequente, no caso dos carcinomas presentes nos canídeos, era o tubular (84,6%), ao passo que no gato encontrava-se um predomínio dos carcinomas de

tipo cribiforme (44%). Tal facto encontra-se de acordo com o afirmado por Misdorp et al. (1999), WHO, que descrevem o carcinoma tubular como sendo frequente no cão, e consideram o tipo cribiforme comum no gato. No estudo efectuado por Peleteiro et al. (1996), o tipo tubular era o tipo histológico mais frequente em neoplasias malignas de cães. Também segundo Ettinger e Feldman (2010), os carcinomas tubulares são um dos tumores malignos mais frequentes na espécie canina. Para além disso, é importante notar que, nas duas espécies, os adenomas pertenciam na sua totalidade ao tipo tubular.

No que diz respeito aos tumores malignos, dois aspectos foram analisados. O primeiro consistiu na avaliação dos graus de malignidade, tendo-se observado na espécie canina, um predomínio do grau II (45%), seguido do grau I (30%). No entanto, nos felinos era o grau III que se encontrava associado a um maior número de tumores (66%), enquanto o grau I correspondia a apenas 6% dos casos. Tais achados vão ao encontro dos resultados descritos anteriormente e corroboram com a pesquisa bibliográfica realizada, evidenciando assim o facto de os tumores mamários pertencentes aos felinos serem geralmente malignos e com uma maior malignidade em termos histológicos e de comportamento biológico, relativamente aos observados nos canídeos.

O segundo aspecto analisado, a propósito das neoplasias malignas, consistiu na comparação entre a existência ou ausência de metastização nos linfonodos regionais e a observação de permeação vascular. Sendo assim, verificou-se que na espécie canina uma pequena percentagem dos linfonodos analisados apresentava metástases de tumor mamário (10,5%), ao contrário do verificado no caso dos gatos, em que 60,2% dos linfonodos possuíam metástases. Mais uma vez, tais resultados apoiam a ideia duma maior malignidade dos tumores mamários na espécie felina. No entanto, nem todos os casos em que foram observadas metástases nos linfonodos regionais se encontravam associados à presença de permeação vascular. De facto, nos canídeos e nos felídeos só em 5,25% e 37,5%, respectivamente, foi verificada a ocorrência simultânea de metastização e de permeação vascular. Porém, uma possível explicação para estes resultados consiste no facto de a invasão dos vasos sanguíneos/linfáticos poder ter ocorrido antes da mastectomia e posterior exame histopatológico, ou simplesmente por não ser possível apanhar todos os vasos passíveis de estarem implicados no processo de metastização, nem todas as secções de corte dos mesmos. Por fim, há também situações em que é observada permeação vascular sem que os linfonodos estejam afectados, as quais só se verificaram na espécie canina. Segundo Kusewitt e Rush (2007), o sítio metastático tem de providenciar um microambiente apropriado para o crescimento das células tumorais e, por isso, uma possível explicação para a ocorrência de tais situações pode ser o facto de nem todas as células neoplásicas que invadem os vasos encontrarem condições no local metastático para se fixarem e multiplicarem. No entanto, fica em aberto a possibilidade destes animais

apresentarem metástases ao nível de outros linfonodos regionais que não foram recolhidos. O facto de, nos felinos, todos os casos em que se verificou permeação vascular estarem associados à existência de metástases nos linfonodos coloca a hipótese de que nestes pacientes possam existir melhores condições, ao nível do local metastático, para ocorrer o fenómeno de metastização.

## 5. Conclusão

O presente estudo foi realizado essencialmente pelo facto dos tumores mamários da espécie felina e canina serem muito frequentes na prática clínica, constituindo, muitas vezes, a causa de morte dos animais afectados. Para além disso, há cada vez mais uma preocupação por parte dos donos, no que diz respeito a aumentar a qualidade de vida e esperança média de vida dos seus animais de companhia. Outro aspecto que estimula o interesse perante o estudo das neoplasias mamárias nas cadelas e nas gatas consiste nas semelhanças encontradas entre estes e os que se desenvolvem na mulher.

Os resultados obtidos são, na sua generalidade, semelhantes aos demonstrados por outros autores, evidenciando o facto das neoplasias mamárias serem uma patologia essencialmente de animais com idade mais avançada, havendo uma tendência para uma maior malignidade em termos histológicos e do comportamento biológico tumoral, à medida que a idade aumenta. Também em concordância com o descrito na literatura, verificou-se uma maior taxa de incidência de tumores malignos e uma maior malignidade histológica associada aos mesmos, no caso dos felídeos, comparativamente com os canídeos. A análise dos linfonodos regionais também foi ao encontro deste aspecto, uma vez que a maior parte dos linfonodos respeitantes à espécie felina apresentava sinais de metastização de tumor mamário, ao contrário do verificado nos cães. Também nos felinos e em oposição ao observado nos canídeos, todos os casos em que havia permeação vascular por células neoplásicas estavam associados à existência de metástases nos linfonodos analisados. No entanto, a frequência relativa de tumores malignos era elevada em ambas as espécies, pondo em aberto a possibilidade de nem todas as massas tumorais, nomeadamente as com característica clínicas indicativas dum comportamento benigno, serem extirpadas e enviadas para exame histopatológico.

Aquando da análise do tipo histológico tumoral, conclui-se que em ambas as espécies todos os adenomas mamários eram de tipo tubular. Porém, no que diz respeito aos carcinomas, observou-se uma maior percentagem de tumores de tipo cribiforme nos gatos, ao passo que nos cães o tipo mais frequente era o tubular. Tendo em conta a classificação

histológica em misto/não misto, os tumores malignos da espécie canina eram, maioritariamente, não mistos, verificando-se o oposto no caso dos tumores benignos.

Atendendo à avaliação das raças mais frequentemente afectadas por neoplasias mamárias, no que se refere aos canídeos e aos felídeos, concluiu-se que estas estão de acordo com o descrito pela maior parte dos autores, embora não se possa afirmar a existência duma predisposição rácica.

Infelizmente, devido à necessidade do trabalho apresentado se demonstrar sucinto e com uma simplicidade relativa, foi apenas feita uma análise dos parâmetros mais gerais respeitantes às neoplasias mamárias. No entanto, espera-se que os resultados obtidos durante a realização desta tese possam servir de apoio a investigações futuras.

Por fim, não será demais referir que a componente prática do estágio curricular se revelou bastante enriquecedora, permitindo desenvolver a destreza manual e mental da autora perante situações diversas. Sendo assim, nos meses correspondentes ao estágio muitos conhecimentos foram apreendidos, servindo estes de base para novas aquisições passíveis de serem obtidas na vida profissional futura.

## 6. Bibliografia

- Ahern, T.E., Bird, R.C., Allison, E., Bird, E.C. & Wolfe, L.G. (1996). Expression of the oncogene c-erbB2 in canine mammary cancers and tumor-derived cell lines. *Amer J Vet Res*, 57(5), 693-696.
- Al-Kuraya, K., Schraml, P., Torhorst J., Tapia, C., Zaharieva, B., Novotny, H., Spichtin, H., Maurer, R., Mirlacher, M., Kochli, O., Zuber, M., Dieterich, H., Mross, F., Wilber, K., Simon R & Sauter, G. (2004). Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer. *Cancer Res*, 64, 8534-8540.
- Allen, S.W., Prasse, K.W. & Mahaffey, E.A. (1986). Cytologic differentiation of benign and malignant canine mammary tumors. *Vet Pathol*, 23(6), 649-655.
- Andersen, A.C. & Rosenblatt, L.S. (1969). The effect of whole body radiation on the median life span of female dogs (beagles). *Rad Res*, 39, 177-200.
- Arditi, J.D., Venihaki, M., Karalis, K.P & Chrousos, G.P. (2007). Antiproliferative effect of adiponectin on MCF7 breast cancer cells: a potential hormonal link between obesity and cancer. *Horm Metab Res*, 39, 9-13.
- Artwohl, M., Roden, M., Holzenbein, T., Freudenthaler, A., Waldhausl, W. & Baumgartner-Parzer, S.M. (2002). Modulation by leptin of proliferation and apoptosis in vascular endothelial cells. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 26, 577-580.
- Banks, W.J. (1993). Integumentary system. In W.J. Banks (Ed.), *Applied veterinary histology* (3<sup>rd</sup> ed.). (pp.306-311). U.S.A: Mosby.
- Barb, D., Pazaitou-Panayitou, K. & Mantzoros, C.S. (2006). Adiponectin: a link between obesity and cancer. *Expert Opin Investig Drugs*, 15, 917-931.
- Barton, C.L. (1983). Cytologic diagnosis of neoplasia and perioperative implementation. *Comp Cont Educ*, 8(2), 72-8.
- Behre, C.J., Gummesson, A., Jernas, M., Lystig, T.C., Fagerberg, B., Carlsson, B. & Carlsson, L.M. (2007). Dissociation between adipose tissue expression and serum levels of adiponectin during and after diet-induced weight loss in obese subjects with and without the metabolic syndrome. *Metabolism*, 56, 1022-1028.
- Bloom, H.J.G & Richardson, W.W. (1957). Histological grading and prognosis in breast cancer. *British Journal of Cancer*, 11, 359-377.
- Boulton, S.J. (2006). Cellular functions of the BRCA tumour suppressor proteins. *Biochem Soc Trans*, 34, 633-645.
- Brearley, M.J. (1989). Mammary gland tumours in the dog. *In Practice*, 11, 248-253.
- Brodey, R.S. (1970). Canine and feline neoplasia. *Advances in veterinary science and comparative medicine*, 14, 309-354.
- Brodey, R.S., Goldschmidt, M.H, Roszel, J.R. (1983). Canine mammary gland neoplasms. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 19, 61-89.

- Brunetti, B., Sarli, G., Preziosi, R., Monari, I. & Benazzi, C. (2005). E-cadherin and  $\beta$ -catenin reduction influence invasion but not proliferation in canine malignant mammary tumors. *Vet Pathol*, 42, 781-787.
- Calafa, J., Weyer, K. & Daams, J.H. (1977). Feline malignant mammary tumours. III. Presence of C particles and intracisternal A particles and their relationship with feline leukemia virus. *Int J Cancer*, 20, 759-767.
- Calle, E.E. & Kaaks, R. (2004). Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer*, 4, 579-591.
- Carpenter G. & Cohen, S. (1979). Epidermal growth factor. *Annu Rev Biochem*, 48, 193-216.
- Carpenter, J.L., Andrews, L.K. & Holtzworth, J. (1987). Tumours and tumour-like lesions. In J. Holtzworth (Ed.), *Diseases of the cat: medicine and surgery*, vol.1. (pp. 406-596). London: WB Saunders.
- Cavalier, E., Frenkel, K., Liehr, J., Rogan, E. & Roy, D. (2000). Oestrogens as endogenous genotoxic agents- DNA adducts and mutations. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 27, 75-93.
- Cavalier, E., Stack, D., Devanesan, P., Todorovic, R., Dwivedy, I., Higginbotham, S., Johansson, S., Patil, K., Gross, M., Gooden, J., Ramanathan, R., Cerny, R. & Rogan, E. (1997). Molecular origin of cancer: catechol oestrogen-3,4-quinines as endogenous tumour initiators. *Proc Nat Acad Sci*, 94, 10937-10942.
- Chen, C., Chang, Y.C., Liu, C.L., Chang, K.J. & Guo, I.C. (2006). Leptin-induced growth of human ZR-75-1 breast cancer cells is associated with up-regulation of cyclin-D1 and c-Myc and down-regulation of tumor suppressor p53 and p21WAF1/CIP1. *Breast Cancer Res Treat*, 98, 121-132.
- Cleary, M.P., Grossmann, M.E. & Ray, A. (2010). Effect of obesity on breast cancer development. *Vet Pathol*, 47(2), 202-213.
- Cohen, D., Reif, J.S., Brodey, R.S. & Keiser, H. (1974). Epidemiological analysis of the most prevalent sites and types of canine neoplasia observed in a veterinary hospital. *Cancer Res*, 34, 2859-2868.
- Considine, R.V., Sinha, M.K., Heiman, M.L., Kriauciunas, A., Stephens, T.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Marco, C.C., McKee, L.J & Bauer, T.L. (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*, 334, 292-295.
- Coster, R., Bekers, J.F., Wouters-Ballman, P. & Ector, F. (1979). Variations de la LH, de la FSH, du 17  $\beta$  oestradiol et de la progestérone au cours du cycle oestral de la chienne. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 23, 177-184.
- Cotard, M.P. (1975). Contribution pour l'étude des tumeurs mammaires dans l'espèce feline. Thèse pour le Doctorat Vétérinaire. Alfort, n.9.
- Dabrosin, C., Margetts, P.J. & Gauldie, J. (2003). Estradiol increases extracellular levels of vascular endothelial growth factor in vivo in murine mammary cancer. *Int J Cancer*, 107, 535-540.
- Davidson, E.B. (2003). Treatment of mammary tumours in dogs and cats. In E.B. Davidson (Ed.), *Proceedings of the North American Veterinary Conference*, pp.1036-1038. Orlando, Florida.

- De las Mulas, J.M., Millán, Y. & Dios, R. (2005). A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor alpha and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. *Vet Pathol*, 42(2), 200-212.
- De las Mulas, J.M., Ordás, J., Millán, M.Y., De Lara, F.C.M., De los Montero, A.E., Reymundo, C. & Jover, A. (2004). Immunohistochemical expression of estrogen receptor  $\beta$  in normal and tumoral canine mammary gland. *Veterinary Pathology*, 41 (3), 269-272.
- De las Mulas, J.M., Van Niel, M., Millán, Y., Ordás, J., Blankenstein, M.A., Van Mil, F. & Misdorp, W. (2002). Progesterone receptors in normal, dysplastic and tumorous feline mammary glands. Comparison with oestrogen receptors status. *Research in Veterinary Science*, 72, 153-161.
- De los Monteros, A.E., Millán, M.Y., Ordás, J., Carrasco, L., Reymundo, C. & de las Mulas, J.M. (2002). Immunolocalization of the smooth muscle-specific protein calponin in complex and mixed tumors of the mammary gland of the dog: assessment of the morphogenetic role of the myoepithelium. *Vet Pathol*, 39, 247-256.
- Destexhe, E., Lespagnard, L., Degeyter, M., Heymann, R. & Coignoul, F. (1993). Immunohistochemical identification of myoepithelial, epithelial and connective tissue cells in canine mammary tumors. *Vet Pathol*, 30, 146-154.
- Díaz, F.R. & López, F.J.B. (2005). Bioestatística. In F.R. Díaz & F.J.B. López (Eds.), *Teste de independência de variáveis qualitativas*. (pp.223-226). Brazil:Thomson.
- Dieudonne, M.N., Bussiere, M., Dos Santos, E., Leneveu M.C., Giudicelli, Y. & Pecquery, R. (2006). Adiponectin mediates antiproliferative and apoptotic responses in human MCF7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 345, 271-279.
- Dobson, J. & Morris, J. (2001). Mammary gland. In J. Dobson & J. Morris (Eds.), *Small animal oncology* (pp.184-191). Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Donnay I., Wouters- Ballman, P., Devleeschouwer, N. & Verstegen, J. (1995b). Changes in the concentrations and affinities of oestrogen, progesterone and epidermal growth factor receptor during the oestrus cycle in normal canine mammary gland and uterus. *Veterinary Research Communications*, 19, 101-113.
- Doré, M., Lanthier, I. & Sirois, J. (2003). Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors. *Vet Pathol*, 40, 207-212.
- Dorn, C.R., Taylor, D.O.N., Frye, F.L. & Hibbard, H.H. (1968). Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California I. Methodology and description of cases. *J Natl Cancer Inst*, 40, 295-305.
- Egenvall, A., Bonnett, B.N., Ohagen, P., Olson, P., Hedhammar, A. & von Euler, H. (2005). Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Prev Vet Med*, 69(1-2), 109-127.
- Else, R.W. & Hannant, D. (1979). Some epidemiological aspects of mammary neoplasia in the bitch. *Veterinary Record*, 104, 296-304.
- Else, R.W. & Hannant, D. (1979). Some epidemiological aspects of mammary neoplasia in the bitch. *Vet Res*, 194, 296-304.

- Enriori, C.L. & Reforzo-Membrives, J. (1984). Peripheral aromatization as a risk factor for breast and endometrial cancer in postmenopausal women. *Gynecol Oncol*, 17, 1-21.
- Ettinger, S.J. & Feldman, E.C. (2010). Textbook of Veterinary Internal Medicine. In S.J.Ettinger & E.C.Feldman (Eds.), *Urogenital and mammary gland tumors*, vol.2. (pp.2211-2212). Missouri: Saunders Elsevier
- Filho, J.C.O., Kommers, G.D., Masuda, E.K., Marques, B.M.F.P.P., Figuera R.A., Irigoyen, L.F. & Barros, C.S.L. (2010). Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. *Pesq Vet Bras*, 30(2), 177-185.
- Fossum, T.W. (2007). Surgery of the reproductive and genital systems. In T.W. Fossum, C.S. Hedlund, A.L. Johnson, K.S. Schulz, H.B. Seim III, M.D. Willard, A. Bahr, G.L. Carrol (Eds.), *Small animal surgery* (3<sup>rd</sup>ed.). (pp.729-739). Missouri, UK: Mosby Elsevier.
- Fowler, E.H., Wilson, G.P. & Koestner, A. (1974). Biological Behavior of canine mammary neoplasms based on a histogenetic classification. *Veterinary Pathology*, 3, 197-288.
- Freeman, D.J., Li, A.G., Wei, G., Li, H.H., Kertesz, N., Lesche, R., Whale, A.D., Martinez-Diaz, H., Rozengurt, N., Cardiff, R.D., Liu, X. & Wu, H. (2003). PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Cell*, 3, 117-130.
- Fujita, Y., Murakami, M., Ogawa, Y., Masuzaki, H., Tanaka, M., Ozaki, S., Nakao, K. & Mimori, T. (2002). Leptin inhibits stress-induced apoptosis of T lymphocytes. *Clin Exp Immunol*, 128, 21-26.
- Funakoshi, Y., Nakayama, H., Uetsuka, K., Nishimura, R., Sasaki, N. & Doi, K. (2000). Cellular proliferative and telomerase activity in canine mammary gland tumors. *Vet Pathol*, 37(2), 177-183.
- Gama, A., Alves, A., Gartner, F. & Schmitt, F.C. (2003). P63: a novel myoepithelial cell marker in canine mammary tissues. *Vet Pathol*, 40, 412-420.
- Gama, A., Gartner, F., Alves, A. & Schmitt, F. (2009). Immunohistochemical expression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) in canine mammary tissues. *Res Vet Sci*, 87(3), 432-437.
- Gama, A., Paredes, J., Albergaria, A., Gartner, F. & Schmitt, F.C. (2004). P-cadherin expression in canine mammary tissues. *J Comp Pathol*, 130, 13-20.
- Gama, A., Paredes, J., Gartner, F., Alves, A. & Schmitt, F. (2008). Expression of E-cadherin, P-cadherin and  $\beta$ -catenin in canine malignant mammary tumours in relation to clinicopathological parameters, proliferation and survival. *The Veterinary Journal*, 177, 45-53
- Gama, A., Paredes, J., Milanezi, M.F., Reis-Filho, J.S., Gartner, F. & Schmitt, F.C. (2002). P-cadherin expression in canine lactating mammary gland. *J Cell Biochem*, 86, 420-421.
- Garofalo, C., Koda, M., Cascio, S., Sulkowska, M., Kanczuga-Koda, L., Golaszewska, J., Russo, A., Sulkowski, S. & Surmacz, E. (2006). Increased expression of leptin and the leptin receptor as a marker of breast cancer progression: possible role of obesity-related stimuli. *Clin Cancer Res*, 12, 1447-1453.

- Gilbertson, S.R., Kurzman, I.D., Zachrau, R.E., Hurvitz, A.I. & Black, M.M. (1983). Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Vet Pathol*, 20(2), 127-142.
- Gorman, N.T. (1991). The mammary glands. In R.A.S. White ( Ed.), *Manual of small animal oncology* ( pp.201-205). Gloucestershire: British Small Animal Veterinary Association.
- Greenblatt, M.S., Bennett, W.P., Hollstein, M. & Harris, C.C. (1994). Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*, 54(18), 4855-4878.
- Griffiths, G.L., Lumsden, J.H. & Valli, V.E.O (1984). Fine needle aspiration cytology and histologic correlation in canine tumors. *Veterinary Clinical Pathology*, 13(1), 13-17.
- Grosch, S., Maier, T.J., Schiffmann, S. & Geisslinger, G. (2006). Cyclooxygenase-2 (Cox-2). Independent anti-carcinogenic effects of selective Cox-2 inhibitors. *J Natl Cancer Inst*, 98, 736-747.
- Hahn, K.A. & Adams, W.H. (1997). Feline mammary neoplasia: biological behavior, diagnosis and treatment alternatives. *Feline Practice*, 25, 5-11.
- Hakkak, R., Holley, A.W., Macleod, S.L., Simpson, P.M., Fuchs, G.J., Jo, C.H., Kieber-Emmons, T. & Korourian, S. (2005). Obesity promotes 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumor development in female zucker rats. *Breast Cancer Res*, 7, R627-R633.
- Hamilton, J.M., Else, R.W. & Forshaw, P. (1976). Oestrogen receptors in feline mammary carcinomas. *The Veterinary Record*, 99, 477-479.
- Hashimoto, S., Yamamura, H., Sato, T., Kanayama, K. & Sakai, T. (2002). Prevalence of mammary gland tumor of small breed dogs in the Tokyo metropolitan area. *Journal of Veterinary Epidemiology*, 6, 85-90.
- Hayden, D.W., Barnes, D.M., Johnston, K.H. (1989). Morphologic changes in the mammary gland of megestrol acetate-treated and untreated cats: a retrospective study. *Veterinary Pathology*, 26, 104-113.
- Hayes, A.A. & Mooney, S. (1985). Feline mammary tumors. *Vet Clin N Amer*, 15, 513-520.
- Hellmén, E. & Lindgren, A. (1989). The accuracy of cytology in diagnosis and DNA analysis of canine mammary tumors. *Journal of Comparative Pathology*, 101(4), 443-450.
- Hellmén, E., Bergstrom, R., Holmberg, L., Spangberg, I.B., Hansson, K. & Lindgren, A. (1993). Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. *Vet Pathol*, 30(1), 20-27.
- Hou, K.W., Xu, Y.X., Yu, T., Zhang, L., Zang, W.W., Fu, C.L., Sun, Y., Wu, Q. & Chen, L. (2007). Adipocytokines and breast cancer risk. *Chin Med J (Engl)*, 120, 1592-1596.
- Hynes, N.E. & Lane, H.A. (2005). ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*, 5, 341-354.
- Illera, J.C., Pérez-Alenza, M.D., Nieto, A., Jiménez, M.A., Silvan, G., Dunner, S., Peña, L. (2006). Steroids and receptors in canine mammary cancer. *Steroids*, STE-6174, 1-8.
- Ishikawa, M., Kitayama, J. & Nagawa, H. (2004). Enhanced expression of leptin and leptin receptor (OB-R) in human breast cancer. *Clin Cancer Res*, 10, 4325-4331.

- ITOH, T., Uchida, K., Ishikawa, K., Kushima, K., Kushima, E., Tamada, H., Moritake, T., Nakao, H. & Shii, H. (2005). Clinicopathological survey of 101 canine mammary gland tumors: differences between small-breed dogs and others. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 67(3), 345-347.
- Ivell, R., Rust, W., Einspanier, A., Hartung, S., Fields, M. & Fuchs A.R. (1995). Oxytocin and oxytocin receptor gene expression in the reproductive tract of pregnant cow: rescue of luteal oxytocin production at term. *Biology of reproduction*, 53 (3), 553-560
- Jabara, A.G. Two cases of mammary neoplasms arising in male dogs (1969). *Austr Vet J*, 45, 476-480.
- Jarde, T., Caldefie-Chezet, F., Damez, M., Mishellany, F., Penault-Llorca, F., Guillot, J. & Vasson, M.P. (2008). Leptin and leptin receptor involvement in cancer development: a study on human primary breast carcinoma. *Oncol Rep*, 19, 905-911.
- Johnston, S.D., Hayden, D.W., Kiang, D.T., Handschin, B. & Johnston, K.H. (1984). Progesterone receptors in feline mammary adenocarcinomas. *American Journal of Veterinary Research*, 45, 379-384.
- Junqueira, L.C. & Carneiro, J. (2004). Aparelho reprodutor feminino. In L.C. Junqueira, J. Carneiro (Eds.), *Histologia básica* (10<sup>th</sup>ed.). (pp.449-452). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Karayannopoulou, M., Kaldrymidou, E., Constantinidis, T.C. & Dessiris, A. (2005). Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. *Journal of Comparative Pathology*, 133, 246-252.
- Kendall, A., Folkard E.J. & Dowsett, M. (2007). Influences on circulating oestrogens in postmenopausal women: relationship with breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 103, 99-109.
- Kitchell, B.E. & Loar, A.S. (1997). Diseases of the mammary gland. In R.V. Morgan (Ed.), *Handbook of small animal practice* (3<sup>rd</sup>ed.). ( pp.615-625). Philadelphia: W.B. Saunders.
- Klopfleisch, R. & Gruber, A.D. (2009). Increased expression of BRCA2 and RAD51 in lymph node metastases of canine mammary adenocarcinomas. *Veterinary Pathology*, 46(3), 416-422.
- Klurfeld, D.M., Lloyd, L.M., Welch, C.B., Davis, M.J., Tulp, O.L. & Kritchevsky, D. (1991). Reduction of enhanced mammary carcinogenesis in LA/N-cp (corpulent) rats by energy restriction. *Proc Soc Exp Biol Med*, 196, 381-384.
- Knudsen, K.A., Frankowski, C., Johnson, K.R. & Wheelock, M.J. (1998). A role for cadherins in cellular signaling and differentiation. *J Cell Biochem*, 30-31 (Suppl.), 168-176.
- Konopleva, M., Mikhail, A., Estrov, Z., Zhao, S., Harris, D., Sanchez-Williams, G., Kornblau, S.M., Dong, J., Kliche, K.O., Jiang, S., Snodgrass, H.R., Estey, E.H. & Andreef, M. (1999). Expression and function of leptin receptor isoforms in myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes: proliferative and anti-apoptotic activities. *Blood*, 93, 1668-1676.
- Kotelevets, L., van Hengel, J., Bruyneel, E., Mareel, M., van Roy, F. & Chastre, E. (2001). The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for stabilizing intercellular junctions and reverting invasiveness. *J Cell Biol*, 155(7), 1129-1135.

- Kotelevets, L., van Hengel, J., Bruyneel, E., Mareel, M., van Roy, F. & Chastre, E. (2005). Implication of the MAGI-1b/PTEN signalosome in stabilization of adherens junctions and suppression of invasiveness. *FASEB J*, 19(1), 115-117.
- Kumaraguruparan, R., Prathiba, D. & Nagini, S. (2006). Of humans and canines: immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours. *Res Vet Sci*, 81(2), 218-224.
- Kusewitt, D.F. & Rush, L.J. (2007). Neoplasia and tumor biology. In M.D. McGavin & J.P. Zachary (Eds.), *Pathologic basis of veterinary disease*. (4<sup>rd</sup> ed.). (pp. 253-298). Missouri: Mosby Elsevier.
- Lagadic, M. & Estrada, M. (1990). Canine mammary tumours: criteria for histologic prognosis and relevance of a grading system. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, número especial de cancerologia.
- Lantinga-van Leeuwen, I.S.L., van Garderen, E., Rutteman, G.R. & Mol, J.A. (2000). Cloning and cellular localization of the canine progesterone receptor: co-localization with growth hormone in the mammary gland. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 75, 219-228.
- Lavalle, G.E., Bertagnolli, A.C., Tavares, W.L.F. & Cassali, G.D. (2009). Cox-2 expression in canine mammary carcinomas: correlation with angiogenesis and overall survival. *Vet Pathol*, 46(6), 1275-1280.
- Lee, C.H., Kim, W.H., Lim, J.H., Kang, M.S., Kim, D.Y. & Kweon, O.K. (2004). Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. *J Vet Sci*, 5(1), 63-69.
- Lester, S.C. (2005). The breast. In S.L. Robbins, R.S. Cotran, V. Kumar, A. Abbas & N. Fausto (Eds.), *Pathologic basis of disease* (7<sup>th</sup>ed.). (pp.1120-1154). Philadelphia: Elsevier Saunders.
- Linjawi, A., Kontogiannea, M., Halwani, F., Edwardes, M. & Meterissian, S. (2004). Prognostic significance of p53, Bcl-2 and Bax expression in early breast cancer. *Journal of American College of Surgeons*, 198, 83-90.
- Lohr, C.V., Teifke, J.P., Failing, K. & Weiss, E. (1997). Characterization of the proliferation state in canine mammary tumors by standardized AgNOR method with postfixation and immunohistologic detection of Ki-67 and PCNA. *Vet Pathol*, 34(3), 212-21.
- Loretti, A.P., Da Silva Ilha, M.R., Ordás, J., De las Mulas, J.M. (2005). Clinical, pathological and immunohistochemical study of feline mammary fibroepithelial hyperplasia following a single injection of depot medroxyprogesterone acetate. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 7, 43-52.
- MacEwen, E.G. (1990). Spontaneous tumors in dogs and cats: models for the study of cancer biology and treatment. *Cancer Metastasis Rev*, 9(2), 125-136.
- MacEwen, E.G., Hayes, A.A., Harvey, H.J., Patnaik, A.K., Mooney, S. & Passe, S. (1984). Prognostic factors for feline mammary tumors. *J Am Vet Med Assoc*, 185, 201-204.
- MacEwen, E.G., Patnaik, A.K., Harvey, H.J. & Panko, W.B. (1982). Estrogen receptors in canine mammary tumors. *Cancer Research*, 42, 2255-2259.

- Madewell, B.R. & Theilen, G.H. (1987). Tumors of the mammary gland. In G.H. Theilen & B.R. Madewell (Eds.), *Veterinary cancer medicine* (pp.327-344). Philadelphia: Lea & Febiger.
- Maehama, T. & Dixon, J.E. (1998). The tumor supressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate. *J Biol Chem*, 273, 13375-13378.
- Magalhães, A.M., Ramadinha, R.R., Barros, C.S.L. & Peixoto, P.V. (2001). Estudo comparativo entre citopatologia e histopatologia no diagnóstico de neoplasias caninas. *Pesq Vet Bras*, 21(1), 23-3.
- Mailot, J.P., Lagneau, F., Parodi, A.L. & André, F. (1980). Particularités des tumeurs mammaires de la chatte. *Point Vétérin*, 11, 107-108.
- Martin, P.M., Cotard, M., Mialot, J.P., André, F. & Raynaud, J.P (1984). Animal models for hormone-dependent human breast cancer. Relationship between steroid receptor profiles in canine and feline mammary tumors and survival rate. *Cancer Chemother Pharmacol*, 12(1), 13-17.
- Masuda, K., Hashizume, C., Kikusui, T., Takeuchi, Y. & Mori, Y. (2004). Breed differences in genotype and allele frequency of catechol-O-methyltransferase gene polymorphic regions in dogs. *J Vet Med Sci*, 66, 183-187.
- Matos, A.J.F., Lopes, C., Carvalheira, J., Santos, M., Rutteman, G.R. & Gartner, F. (2006). E-cadherin expression in canine malignant mammary tumors: relationship to other clinico-pathological variables. *J Comp Pathol*, 134, 182-189.
- Mayr, B., Dressler, A., Reifinger, M. & Feil, C. (1998). Cytogenetic alterations in eight mammary tumors and tumor-suppressor gene p53 mutation in one mammary tumor from dogs. *Am J Vet Res*, 59, 69-78.
- Ménard, G., Fontaine, M. & Morin, M. (1986). Fine needle aspiration biopsy of malignant tumours in dogs and cats. A report of 102 cases. *Canadian Veterinary Journal*, 27, 504-510.
- Millanta, F., Calandrella, M., Citi, S., Della Santa, D. & Poli, A. (2005). Overexpression of HER-2 in feline invasive mammary carcinomas: an immunohistochemical survey and evaluation of its prognostic potencial. *Vet Pathol*, 42(1), 30-34.
- Millanta, F., Citi, S., Della Santa, D., Porciani, M. & Poli, A. (2006). COX-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. *Breast Cancer Res Treat*, 98, 115-120.
- Mills, J.N & Griffiths, G.L. (1984). The accuracy of clinical diagnoses by fine-needle aspiration cytology. *Aust Vet J*, 61(8), 269-271.
- Misdorp, W. & Hart, A.A.M. (1976). Prognostic factors in canine mammary cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 56, 779-784.
- Misdorp, W. (2002). Tumors of the mammary gland. In D.J. Meuten (Ed.), *Tumors in domestic animals* (4<sup>th</sup> ed.). (pp. 575-606). Iowa: Iowa State Press.
- Misdorp, W., Else, R. W., Hellmén, E. & Lipscomb, T. P. (1999). Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. In *World Health Organization international histological classification of tumors of domestic animals* (2nd ed., Vol. VII). Washington, D. C.: Armed Forces Institute of Pathology in cooperation with the

- American Registry of Pathology and the World Health Organization Collaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology.
- Misdorp, W., Romijn, A. & Hart, A.A.M. (1991). Feline mammary tumors: a case-control study of hormonal factors. *Anticancer Res*, 11, 1793-1798.
- Mitchell, L., De la Iglesia, F.A. & Wenkoff, M.S. (1974). Mammary tumors in dogs: survey of clinical and pathological characteristics. *Canad Vet J*, 15, 131-138.
- Mol, J.A., van Garderen, E., Selman, P.J., Wolfswinkel, J., Rijnberk, A.D., Rutteman, G.R. (1995a). Growth hormone mRNA in mammary gland tumors of dogs and cats. *Journal of Clinical Investigation*, 95, 2028-2034.
- Monlux, A.W., Roszel, J.F., MacVean, D.W. & Palmer, T.W. (1977). Classification of epithelial canine mammary tumours in a defined population. *Vet Pathol*, 14, 194-217.
- Morrison, W.B. (1998). Canine and feline mammary tumors. In W.B. Morrison (Ed.), *Cancer in dogs and cats: medical and surgical management* (pp. 591-598). Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins.
- Moulton, J.E., Rosenblatt, L.S. & Goldman, M. (1986). Mammary tumors in a colony of beagle dogs. *Vet Pathol*, 23, 741-749.
- Murphy, L.C. & Watson, P. (2002). Steroid receptors in human breast carcinogenesis and breast cancer progression. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 56, 65-77.
- Nakopoulou, L.L., Alexiadou, A., Theodoropoulos, G.E., Lazaris, A.C., Tzonou, A. & Keramopoulos, A. (1996). Prognostic significance of the co-expression of p53 and c-erbB-2 proteins in breast cancer. *J Pathol*, 179(1), 31-38.
- Nieto, A., Peña, L., Pérez-Alenza, M.D., Sánchez, M.A., Flores, J.M. & Castaño, M. (2000). Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Vet Pathol*, 37, 239-247.
- Nieto, A., Pérez-Alenza, M.D., Del Castillo, N., Tabanera, E., Castaño, M. & Peña, L. (2003). BRCA1 expression in canine mammary dysplasias and tumours: relationship with prognostic variables. *J Comp Pathol*, 128, 260-268.
- Ordás, J., Millán, Y., De los Monteros, A.E., Reymundo, C. & De las Mulas, J.M. (2004). Immunohistochemical expression of progesterone receptors, growth hormone and insuline growth factor-I in feline fibroadenomatous change. *Research in Veterinary Science*, 76, 227-233.
- Owen, L.N. & Briggs, M.H. (1976). Contraceptive steroid toxicity in the beagle dog and its relevance to human carcinogenicity. *Current Medical Research Opinion*, 4, 309-329.
- Owen, L.N. (1980). World Health Organization clinical stage classification, TNM classification of tumors in domestic animals. In S.J. Withrow & E.G. MacEwen (Eds.), *Clinical Veterinary Oncology*. ( 3<sup>rd</sup>ed.). (pp.461; 469-470). Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Palacios, J., Benito, N., Pizarro, A., Suarez, A., Espada, J., Cano, A. & Gamallo, C. (1995). Anomalous expression of P-cadherin in breast carcinoma: correlation with E-cadherin expression and pathological features. *Amer J Pathol*, 146, 605-612.
- Park, K., Han, S., Shin, E., Kim, H.J. & Kim, J.Y. (2007). EGFR gene and protein expression in breast cancers. *Eur J Surg Oncol*, 33, 956-960.

- Parodi, A.L., Misdorp, W., Mialot, M., Hart, A.A.M., Hurtrel, M. & Salomon, J.C. (1983). Intratumoral BCG and *Corynebacterium parvum* therapy of canine mammary tumours before radical mastectomy. *Cancer Immunol Immunother*, 15, 172-177.
- Patsikas, M.N. & Dessiris, A. (1996a). The lymph drainage of the mammary glands in the bitch: a lymphographic study. Part I: the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup>, and 5<sup>th</sup> mammary glands. *Anat Histol Embryol*, 25(2), 131-138.
- Patsikas, M.N., Karayannopoulou, M., Kaldrymidoy, E., Papazoglou, L.G., Papadopoulou, P.L., Tzegas, S.I., Tziris, N.E., Kaitzis, D.G., Dimitriadis, A.S. & Dessiris, A.K. (2006). The lymph drainage of the neoplastic mammary glands in the bitch: a lymphographic study. *Anat Histol Embryol*, 35(4), 228-234.
- Peleteiro M.C & Rodrigues, A.I.P (1991). O exame citológico em medicina veterinária, punção aspirativa com agulha fina. *Veterinária Técnica*, 1(2), 30-36.
- Peleteiro, C., Branco, S. & Correia, J. (1996). Estudo epidemiológico de tumores mamários em cadela. In C. Peleteiro, S. Branco & J. Correia, *Libro de Actas-VIII Reunion Sociedad Española de Anatomía Patológica Veterinária (SEAPV)*, p.66. Córdoba, Espanha.
- Peleteiro, M.C & Correia, J.J. (1993). Classificação TNM dos tumores mamários de cadela e gata. *Medicina Veterinária*, 44, 47-50.
- Peleteiro, M.C. & Correia, J.J. (1992). Diagnostic cytology of canine breast cancer. Hormonal receptors. *Medicina Veterinária*, 9 (número especial), 86-87.
- Peleteiro, M.C. (1994). Tumores mamários na cadela e na gata. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, LXXXIX(509), 10-34.
- Peña, L.L., Nieto, A.I., Pérez-Alenza, D., Cuesta, P. & Castaño, M. (1998). Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. *J Vet Diagn Invest*, 10(3), 237-246.
- Pereira, C.T., Rahal, S.C., Baliero, J.C.C. & Ribeiro, A.A.C. (2003). Lymphatic drainage on healthy and neoplastic mammary glands in female dogs: Can it really be altered? *Anat Histol Embryol*, 32, 282-290.
- Pereira, P.D., Lopes, C.C., Matos, A.J.F., Pinto, D., Gartner, F., Lopes, C. & Medeiros, R. (2009). Influence of catechol-O-methyltransferase (COMT) genotypes on the prognosis of canine mammary tumors. *Vet Pathol*, 46(6), 1270-1274.
- Pérez-Alenza, M.D., Jiménez, A., Nieto, A.I. & Peña, L. (2004). First description of feline inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical characteristics of three cases. *Breast Cancer Res*, 6(4), R300-307.
- Pérez-Alenza, M.D., Peña, L., Del Castillo, N. & Nieto, A.I. (2000). Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumors. *Journal of Small Animal Practice*, 41, 287-291.
- Preziosi, R., Sarli, G., Benazzi, C. & Marcato, P.S. (1995). Detection of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in canine and feline mammary tumors. *J Comp Pathol*, 113 (4), 301-13.
- Preziosi, R., Sarli, G., Benazzi, C., Mandrioli, L. & Marcato, P.S. (2002). Multiparametric survival analysis of histological stage and proliferative activity in feline mammary carcinomas. *Res Vet Sci*, 73(1), 53-60.

- Queiroga, F.L. (2010). Clínica dos tumores da mama: o que é preciso saber. In APMVEAC (Associação Portuguesa de Médicos Veterinários Especialistas em Animais de Companhia) (Eds.), *Livro de Resumos: Medicina interna/doenças infecciosas, gastroenterologia, dermatologia, cirurgia de tecidos moles, exóticos e GIEs*, 19º Congresso nacional, 21 a 23 de Maio. Lisboa.
- Queiroga, F.L., Pérez-Alenza, M.D., Silvan G., Peña, L., Lopes, C. & Illera, J.C. (2005). Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 94, 181-187.
- Raharison, F. & Sautet, J. (2006). Lymph drainage of the mammary glands in female cats. *J Morphol*, 267(3), 292-299.
- Rehm, S., Stanislaus, D.J. & Williams, A.M. (2007). Estrous cycle-dependent histology and review of sex steroid receptor expression in dog reproductive tissues and mammary gland and associated hormone levels. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 80(3), 233-245.
- Reis-Filho, J.S., Milanezi, F., Carvalho, S., Simpson, P.T., Steele, D., Savage, K., Lambros, M.B., Pereira, E.M., Nesland J.M., Lakhani, S.R. & Schmitt F.C. (2005). Metaplastic breast carcinomas exhibit EGF-R, but not HER-2, gene amplification and overexpression immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization analysis. *Breast Cancer Res*, 7(RA), 1028-1035.
- Reis-Filho, J.S., Pinheiro, C., Lambros, M.B., Milanezi, F., Carvalho, S., Savage, K., Simpson, P.T., Jones, C., Swift, S., Mackay, A., Reis, R.M., Hornick, J.L., Pereira, E.M., Baltazar, F., Fletcher, C.D., Ashworth, A., Lakhani, S.R. & Schmitt, F.C. (2006). EGFR amplification and lack of activating mutations in metaplastic breast carcinomas. *J Pathol*, 209, 445-453.
- Ressel, L., Millanta, F., Caleri, E., Innocenti, V.M. & Poli, A. (2009). Reduced PTEN protein expression and its prognostic implications in canine and feline mammary tumors. *Vet Pathol*, 46(5), 860-868.
- Rose, D.P., Komninou, D. & Stephenson, G.D. (2004). Obesity, adipocytokines and insulin resistance in breast cancer. *Obes Rev*, 5, 153-165.
- Rungsipipat, A., Tateyama, S., Yamaguchi, R., Uchid, K., Miyoshi, N. & Hayashi, T. (1999). Immunohistochemical analysis of c-yes and c-erbB2 oncogene products and p53 tumour suppressor protein in canine mammary tumours. *J Vet Med Sci*, 61, 27-32.
- Rutteman, G.R., Withrow, S.J. & MacEwen, E.G. (2001). Tumors of the mammary gland. In S.J. Withrow & E.G. MacEwen (Eds.), *Small animal clinical oncology* (3<sup>rd</sup> ed.). (pp.455-477). Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Saba, C.F., Rogers, K.S., Newman, S.J., Mauldin, G.E. & Vail, D.M. (2007). Mammary gland tumors in male dogs. *J Vet Intern Med*, 21(5), 1056-1059.
- Sassen, A., Rochon, J., Wild, P., Hartmann, A., Hofstaedter, F., Schwarz, S. & Brockhoff, G. (2008). Cytogenetic analysis of HER1/EGFR, HER2, HER3 and HER4 in 278 breast cancer patients. *Breast Cancer Res*, 10(1), R2.
- Sassen, A., Rochon, J., Wild, P.J., Hartmann, A., Hofstaedter, F., Schwarz, S. & Brockhoff, G. (2008). Cytogenetic analysis of HER1/EGFR, HER2, HER3 and HER4 in 278 breast cancer patients. *Breast Cancer Res*, 10 (R2).

- Saxena, N.K., Vertino, P.M., Anania, F.A. & Sharma, D. (2007). Leptin- induced growth stimulation of breast cancer cells involves recruitment of histone acetyltransferases and mediator complex to cyclin D1 promoter via activation of Stat3. *J Biol Chem*, 282, 13316-13325.
- Sayasith, K., Sirois, J. & Doré, M. (2009). Molecular characterization of feline COX-2 and expression in feline mammary carcinomas. *Vet Pathol*, 46(3), 423-429.
- Schindler, T.H., Cardenas, J., Prior, J.O., Facta, A.D., Kriessl, M.C., Zhang, X.L., Sayre, J., Dahlbom, M., Licinio, J. & Schelbert, H.R. (2006). Relationship between increasing body weight, insulin resistance, inflammation, adipocytokines, leptin and coronary circulation function. *J Am Coll Cardiol*, 47, 1188-1195.
- Schneider, R., Dorn, C.R., Taylor D.O. (1969). Factors influencing canine mammary development and postsurgical survival. *Journal of National Cancer Institute*, 43(6), 1249-1261.
- Scully, R., Chen, J., Ochs, R.L., Keegan, K., Hoekstra, M., Feunteun, J. & Livingston, D.M. (1997). Dynamic changes of BRAC1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage. *Cell*, 90, 425-435.
- Shaw, J.A., Udokang, K., Mosquera, J.M., Chauhan, H., Jones, J.L. & Walker, R.A. (2002). Oestrogen receptors alpha and beta in normal human breast and breast carcinomas. *Pathology*, 198, 450-457.
- Shien, T., Tashiro, T., Omatsu, T., Masuda, T., Furuta K., Sato N., Akashi-Tanaka, S., Uehara, M., Iwamoto, E., Kinoshita, T., Fukutomi, T., Tsuda, H. & Hasegawa, T. (2005). Frequent overexpression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in mammary high grade ductal carcinomas with myoepithelial differentiation. *J Clin Pathol*, 58(12), 1299-1304.
- Shimoyama, Y., Hirohashi, S., Hirano, S., Noguchi, M., Shimosato, Y., Takeichi, M. & Abe, O. (1989). Cadherin cell adhesion molecules in human epithelial tissues and carcinomas. *Cancer Res*, 49, 2128-2133.
- Simpson, E.R. & Zhao, Y. (1996). Estrogen biosynthesis in adipose: significance in breast cancer development. *Ann N Y Acad Sci*, 784, 18-26.
- Skorupski K.A., Overley B., Shofer F.S., Goldschmidt, M.H., Miller C.A. & Sorenmo K.U. (2005). Clinical characteristics of mammary carcinoma in male cats. *J Vet Intern Med*, 19(1), 52-55.
- Solano-Gallego, L. (2010). Reproductive system. In R.E. Raskin, D.J. Meyer (Eds.), *Canine and feline cytology. A color atlas and interpretation guide*. (pp. 274-282). Missouri, UK: Saunders Elsevier.
- Sonnenschein, E.G., Glickman, L.T., Goldschmidt, M.H. & McKee, L.J. (1991). Body conformation, diet and risk of breast cancer in pet dogs: a case-control study. *Am J Epidemiol*, 133, 694-703.
- Stan, F., Damian, A., Gudea, A., Chirilean, I., Socaciu, A., Crisan, M., Dezdrobitu, C. & Ayman, A.R. (2009). Study of the lymphatic mammary connections in bitch. *Bulletin UASVM Veterinary Medicine*, 66(1), 107-113.
- Stan, F., Gudea, A., Damian, A. & Socaciu, A. (2007). Morphological aspects of the auxiliary lymphonodes in dog. *Bulletin UASVM Veterinary Medicine*, 64(1-2), pp.311-315.

- Suo, Z., Riesberg, B., Kallsson, M.G., Willman, K., Tierens, A., Skovlund, E. & Nesland, J.M. (2002). EGF-R family in breast carcinomas. C-erbB2 and c-erbB4 receptors have different effects on survival, *J Pathol*, 196, 17-25.
- Tamguney, T. & Stokoe, D. (2007). New insights into PTEN. *J Cell Sci*, 120, 4071-4079.
- Taylor, G.N., Shabestari, L. & Williams, J. (1976). Mammary neoplasia in a closed beagle colony. *Cancer Res*, 36, 2740-2743.
- Thuróczy, J., Reisvaag, G.J., Perge, E., Tibold, A., Szilágyi, J. & Balogh, L. (2007). Immunohistochemical detection of progesterone and cellular proliferation in canine mammary tumours. *J Comp Pathol*, 137 (2-3), 122-129.
- Tvedten, H. (1994). Cytology of neoplastic and inflammatory masses. In M.D. Williard, H. Tvedten, G. Turnwald (Ed.), *Small animal clinical diagnosis by laboratory methods*. (pp. 321-341). Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- van Garderen, E., Dewit, M., Voorhout, W.F., Rutteman, G.R., Mol, J.A., Nederbragt, H. & Misdorp, W. (1997). Expression of growth hormone in canine mammary tissue and mammary tumors. Evidence for a potential autocrine/ paracrine stimulatory loop. *American Journal of Pathology*, 150, 1037-1047.
- van Garderen, E., van der Poel, H.J.A., Swennenhuis, J.F., Wissink, E.H.J., Rutteman, G.R., Hellmén, E., Mol, J.A. & Schalken, J.A. (1999). Expression and molecular characterization of the growth hormone receptor in canine mammary tissue and mammary tumors. *Endocrinology*, 140, 5907-5914.
- Veldhoen, N., Watterson, J., Brash, M. & Milner, J. (1999). Identification of tumour-associated and germ line p53 mutations in canine mammary cancer. *Br J Cancer*, 81, 409-415.
- Viadel, L., Borràs, D. & Morales, M.J. (2005). Tumores de la glándula mamaria. In L. Viadel, D. Borràs & M.J. Morales (Eds.), *Atlas clínico de citología de los tumores del perro y el gato*. (pp.120-124). Barcelona: Esmonpharma.
- Vollmerhaus, B. & Roos, H. (1997). On the regional lymph nodes of mammary gland in the domestic cat - a summarizing study. *Kleintierpraxis*, 42, 221-229.
- Wathes, D.C. & Swann, R.W. (1982). Is oxytocin an ovarian hormone? *Nature*, 297, 225-227
- Werner, J.A. (1995). The lymph vessel system of the mouth cavity and pharynx. *Laryngorhinootologie*, 74, 622-628.
- Weyer, K. & Hart, A.A.M. (1983). Prognostic factors in feline mammary carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 70, 709-716.
- Williams, L. (2003). Predictors of tumor response. In L. Williams (Ed.), *Proceedings of the North American Veterinary Conference*, pp. 679-681. Orlando, Florida.
- Wu, M.H., Chou, Y.C., Yu, J.C., Yu, C.P., Wu, C.C., Chu, C.M., Yang, T., Lai, C.H., Hsieh, C.Y., You, S.L., Chen, C.J. & Sun, C.A. (2006). Hormonal and body-size factors in relation to breast cancer risk: a prospective study of 111,889 women in a low-incidence area. *Ann Epidemiol*, 16, 223-229.
- Yamagami, T., Kobayashi, T., Takahashi, K. & Sugiyama, M. (1996). Prognostic for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification. *J Vet Med Sci*, 58, 1079-1083.

- Zappulli, V., De Zan, G., Cardazzo, B., Bargelloni, L. & Castagnaro, M. (2005). Feline mammary tumors in comparative oncology. *J Dairy Res*, 72 (Spec No), 98-106.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. & Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372, 425-432.
- Zuccari, D.A.P.C., Santana, A.E. & Rocha, N.S. (2001). Correlação entre a citologia aspirativa por agulha fina e a histologia no diagnóstico de tumores mamários de cadelas. *Braz J vet Res anim Sci*, 38(1), 38-41.
- Zuccari, D.A.P.C., Santana, A.E., Cury, P.M. & Cordeiro, J.A. (2004). Immunohistochemical study of Ki-67 as a prognostic marker in canine mammary neoplasia. *Vet Clin Pathol*, 33(1),23-28.

## Anexo I – Resultados adicionais

### 1. Canídeos domésticos

#### 1.1. Idade

### Teste de Independência de duas variáveis qualitativas (Teste do $\chi^2$ )

VARIÁVEIS QUALITATIVAS	MODALIDADES/CATEGORIAS		
Escalões Etários	Escalão Etário 1 (ET <sub>1</sub> )	Escalão Etário 2 (ET <sub>2</sub> )	Escalão Etário 3 (ET <sub>3</sub> )
Variável qualitativa 2	Tumor maligno (TM)	Tumor benigno (TB)	

#### EXEMPLO

<b>DADOS</b>	<b>Tabela de Contingência</b> (Tabela das frequências observadas: $O_{i,j}$ , $i = 1, 2, \dots, r$ , $j = 1, 2, \dots, c$ )
--------------	---

$r =$	<b>3</b>	$c =$	<b>2</b>
-------	----------	-------	----------

	TM (j=1)	TB (j=2)	Total
ET <sub>1</sub> (i=1)	23	7	30
ET <sub>2</sub> (i=2)	175	29	204
ET <sub>3</sub> (i=3)	74	5	79
Total	272	41	313

Total - Frequências absolutas marginais

#### Teste de Hipóteses

Hipótese nula	$H_0$	As variáveis qualitativas são independentes
Hipótese alternativa	$H_1$	As variáveis qualitativas não são independentes

Nível de significância do teste ( $\alpha$ ) = 0,05

Tabela das frequências esperadas:  $E_{ij}$ ,  $i = 1, 2, \dots, r$ ,  $j = 1, 2, \dots, c$ 

	TM (j=1)	TB (j=2)	Total
ET <sub>1</sub> (i=1)	26,07	3,93	30,00
ET <sub>2</sub> (i=2)	177,28	26,72	204,00
ET <sub>3</sub> (i=3)	68,65	10,35	79,00
Total	272,00	41,00	<b>313,00</b>

## Cálculos intermédios

A) Diferenças: $D_{ij} = O_{ij} - E_{ij}$	B) Quadrado das diferenças: $(D_{ij})^2$	C) Quadrado das diferenças: $(D_{ij})^2 / E_{ij}$
---	--	---

	TM (j=1)	TB (j=2)
ET <sub>1</sub> (i=1)	-3,07	3,07
ET <sub>2</sub> (i=2)	-2,28	2,28
ET <sub>3</sub> (i=3)	5,35	-5,35

	TM (j=1)	TB (j=2)
ET <sub>1</sub> (i=1)	9,43	9,43
ET <sub>2</sub> (i=2)	5,19	5,19
ET <sub>3</sub> (i=3)	28,60	28,60

	TM (j=1)	TB (j=2)
ET <sub>1</sub> (i=1)	0,36	2,40
ET <sub>2</sub> (i=2)	0,03	0,19
ET <sub>3</sub> (i=3)	0,42	2,76

## RESUMO DO TESTE

Valor calculado da estatística ( $\chi^2_{\text{obs}}$ ): **6,16**Graus de liberdade  $((r-1)*(c-1))$ : **2**Valor crítico da estatística: **5,991465**Valor  $p$  (p-value): **0,045853**

Valor calculado da estatística excede valor crítico

Valor  $p$  (p-value) menor que nível de significância**Conclusão do teste de hipótese:** Rejeitar a Hipótese Nula (Aceitar a Hipótese Alternativa)Nota: ET<sub>1</sub>: ≤3 a 6-7 anos; ET<sub>2</sub>: 7-8 a 11-12 anos; ET<sub>3</sub>: 12-13 a ≥ 15 anos

## 1.2. Misto/não misto

### Teste de Independência de duas variáveis qualitativas (Teste do $\chi^2$ )

VARIÁVEIS QUALITATIVAS	MODALIDADES/CATEGORIAS	
Variável qualitativa 1	Tumor maligno (TM)	Tumor benigno (TB)
Variável qualitativa 2	Misto (NM)	Não misto (NM)

## EXEMPLO

<b>DADOS</b>	<b>Tabela de Contingência (Tabela das frequências observadas: <math>O_{i,j}</math>, <math>i = 1,2,\dots,r</math>, <math>j = 1,2,\dots,c</math>)</b>			
	$r =$	<b>2</b>	$c =$	<b>2</b>

	M (j=1)	NM (j=2)	FM
TM (i=1)	97	234	331
TB (i=2)	26	22	48
FM	123	256	<b>379</b>

FM - Frequências Marginais

### Teste de Hipóteses

Hipótese nula	$H_0;$	<b>As variáveis qualitativas são independentes</b>
Hipótese alternativa	$H_1;$	<b>As variáveis qualitativas não são independentes</b>

Nível de significância do teste ( $\alpha$ ) = **0,05**

<b>Tabela das frequências esperadas: <math>E_{i,j}</math>, <math>i = 1,2,\dots,r</math>, <math>j = 1,2,\dots,c</math></b>
---

	M (j=1)	NM (j=2)	FM
TM (i=1)	107,42	223,58	331,00
TB (i=2)	15,58	32,42	48
FM	123	256	<b>379</b>

### Cálculos intermédios

A) Diferenças		B) Quadrado das diferenças		(Quadrado das diferenças)/Diferenças				
	M (j=1)	NM (j=2)		M (j=1)	NM (j=2)		M (j=1)	NM (j=2)
TM (i=1)	-10,42	10,42	TM (i=1)	108,62	108,62	TM (i=1)	1,01	0,49
TB (i=2)	10,42	-10,42	TB (i=2)	108,62	108,62	TB (i=2)	6,97	3,35

## RESUMO DO TESTE

Valor calculado da estatística ( $\chi^2_{\text{obs}}$ ):	<b>11,82</b>	
Graus de liberdade (( $r-1$ )*( $c-1$ )):	<b>1</b>	
Valor crítico da estatística:	<b>3,841459</b>	Valor calculado da estatística excede valor crítico
Valor $p$ ( $p$ -value):	<b>0,000586</b>	Valor $p$ ( $p$ -value) menor que nível de significância
<b>Conclusão do teste de hipótese:</b>	<b>Rejeitar a Hipótese Nula (Aceitar a Hipótese Alternativa)</b>	

## 1.3.Mamas afectadas

Teste de Independência de duas variáveis qualitativas (Teste do  $\chi^2$ )

VARIÁVEIS QUALITATIVAS	MODALIDADES/CATEGORIAS		
Mamas afectadas	Mamas 1-2 (M1-2)	Mamas 3-4 (M3-4)	Mamas 5-6 (M5-6)
Variável qualitativa 2	Tumor maligno (TM)	Tumor benigno (TB)	

DADOS	Tabela de Contingência (Tabela das frequências observadas: $O_{i,j}$ , $i = 1,2,\dots,r$ , $j = 1,2,\dots,c$ )			
	$r =$	<b>3</b>	$c =$	<b>2</b>
		TM (j=1)	TB (j=2)	Total
	M1-2 (i=1)	218	38	256
	M3-4 (i=2)	40	4	44
	M5-6(i=3)	5	2	7
	<b>Total</b>	<b>263</b>	<b>44</b>	<b>307</b>

Total - Frequências absolutas marginais

## Teste de Hipóteses

Hipótese nula	$H_0;$	As variáveis qualitativas são independentes
Hipótese alternativa	$H_1;$	As variáveis qualitativas não são independentes

Nível de significância do teste ( $\alpha$ ) = **0,05**

Tabela das frequências esperadas:  $E_{i,j}$ ,  $i = 1, 2, \dots, r$ ,  $j = 1, 2, \dots, c$ 

	TM (j=1)	TB (j=2)	Total
M1-2 (i=1)	219,31	36,69	256,00
M3-4 (i=2)	37,69	6,31	44,00
M5-6 (i=3)	6,00	1,00	7,00
Total	263,00	44,00	307,00

## Cálculos intermédios

A) Diferenças:  $D_{i,j} = O_{i,j} - E_{i,j}$     B) Quadrado das diferenças:  $(D_{i,j})^2$     C) Quadrado das diferenças:  $(D_{i,j})^2 / E_{i,j}$

	TM (j=1)	TB (j=2)
M1-2 (i=1)	-1,31	1,31
M3-4 (i=2)	2,31	-2,31
M5-6 (i=3)	-1,00	1,00

	TM (j=1)	TB (j=2)
M1-2 (i=1)	1,71	1,71
M3-4 (i=2)	5,32	5,32
M5-6 (i=3)	0,99	0,99

	TM (j=1)	TB (j=2)
M1-2 (i=1)	0,01	0,05
M3-4 (i=2)	0,14	0,84
M5-6 (i=3)	0,17	0,99

## RESUMO DO TESTE

Valor calculado da estatística

$(\chi^2_{\text{obs}})$ : **2,19**

Graus de liberdade  $((r-1)*(c-1))$ : **2**

Valor crítico da estatística: **5,991465**

Valor  $p$  (p-value): **0,333709**

Valor calculado da estatística menor que valor crítico

Valor  $p$  (p-value) maior que nível de significância

**Conclusão do teste de hipótese:** Não rejeitar a Hipótese Nula (falta de evidência experimental)

## 1.4.Fêmas OVH/ inteiras; Tumor maligno/ benigno

**Teste de Independência de duas variáveis qualitativas (Teste do  $\chi^2$ )**

VARIÁVEIS QUALITATIVAS	MODALIDADES/CATEGORIAS	
Variável qualitativa 1	Ovario-Histerectomizadas (OVH)	Inteiras (I)
Variável qualitativa 2	Tumor benigno (TB)	Tumor maligno (TM)

<b>DADOS</b>	Tabela de Contingência (Tabela das frequências observadas: $O_{i,j}$ , $i = 1,2,\dots,r$ , $j = 1,2,\dots,c$ )			
	$r =$	<b>2</b>	$c =$	<b>2</b>

	TB (j=1)	TM (j=2)	FM
OVH (i=1)	16	71	87
I (i=2)	31	213	244
FM	47	284	<b>331</b>

FM - Frequências Marginais

**Teste de Hipóteses**

Hipótese nula	$H_0$ ;	<b>As variáveis qualitativas são independentes</b>
Hipótese alternativa	$H_1$ ;	<b>As variáveis qualitativas não são independentes</b>

Nível de significância do teste ( $\alpha$ ) = **0,05**

Tabela das frequências esperadas:  $E_{i,j}$ ,  $i = 1,2,\dots,r$ ,  $j = 1,2,\dots,c$ )

	TB (j=1)	TM (j=2)	FM
OVH (i=1)	12,35	74,65	87,00
I (i=2)	34,65	209,35	244
FM	47	284	<b>331</b>

**Cálculos intermédios**

A) Diferenças		B) Quadrado das diferenças		(Quadrado das diferenças)/Diferenças				
	TB (j=1)	TM (j=2)		TB (j=1)	TM (j=2)			
OVH (i=1)	3,65	-3,65	OVH (i=1)	13,30	13,30	OVH (i=1)	1,08	0,18
I (i=2)	-3,65	3,65	I (i=2)	13,30	13,30	I (i=2)	0,38	0,06

## RESUMO DO TESTE

Valor calculado da estatística ( $\chi^2_{\text{obs}}$ ):	<b>1,70</b>	
Graus de liberdade (( $r-1$ )*( $c-1$ )):	<b>1</b>	
Valor crítico da estatística:	<b>3,841459</b>	Valor calculado da estatística menor que valor crítico
Valor $p$ (p-value):	<b>0,192048</b>	Valor $p$ (p-value) maior que nível de significância
<b>Conclusão do teste de hipótese:</b> Não rejeitar a Hipótese Nula (falta de evidência experimental)		

## 1.5. Fêmeas OVH/ inteiras; Tumor mamário/ outras lesões

Teste de Independência de duas variáveis qualitativas (Teste do  $\chi^2$ )

VARIÁVEIS QUALITATIVAS	MODALIDADES/CATEGORIAS	
Variável qualitativa 1	Ovario-Histerectomizadas (OVH)	Inteiras (I)
Variável qualitativa 2	Tumor mamário (T)	Outras lesões (OL)

<b>DADOS</b>	Tabela de Contingência (Tabela das frequências observadas: $O_{i,j}$ , $i = 1,2,\dots,r$ , $j = 1,2,\dots,c$ )			
	$r =$	<b>2</b>	$c =$	<b>2</b>

	T (j=1)	OL (j=2)	FM
OVH (i=1)	87	8	95
I (i=2)	244	23	267
FM	331	31	<b>362</b>

FM - Frequências Marginais

## Teste de Hipóteses

Hipótese nula	$H_0$ ;	As variáveis qualitativas são independentes
Hipótese alternativa	$H_1$ ;	As variáveis qualitativas não são independentes

Nível de significância do teste ( $\alpha$ ) = 0,05Tabela das frequências esperadas:  $E_{i,j}$ ,  $i = 1,2,\dots,r$ ,  $j = 1,2,\dots,c$ 

	T (j=1)	OL (j=2)	FM
OVH (i=1)	86,86	8,14	95,00
I (i=2)	244,14	22,86	267
FM	331	31	<b>362</b>

Cálculos intermédios								
A) Diferenças			B) Quadrado das diferenças			(Quadrado das diferenças)/Diferenças		
	T (j=1)	OL (j=2)		T (j=1)	OL (j=2)		T (j=1)	OL (j=2)
OVH (i=1)	0,14	-0,14	OVH (i=1)	0,02	0,02	OVH (i=1)	0,00	0,00
I (i=2)	-0,14	0,14	I (i=2)	0,02	0,02	I (i=2)	0,00	0,00

RESUMO DO TESTE	
Valor calculado da estatística ( $\chi^2_{\text{obs}}$ ):	<b>0,00</b>
Graus de liberdade $((r-1)*(c-1))$ :	<b>1</b>
Valor crítico da estatística:	<b>3,841459</b> Valor calculado da estatística menor que valor crítico
Valor p (p-value):	<b>0,953917</b> Valor p (p-value) maior que nível de significância
<b>Conclusão do teste de hipótese:</b>	<b>Não rejeitar a Hipótese Nula (falta de evidência experimental)</b>

### 1.6. Simples/complexo

### Teste de Independência de duas variáveis qualitativas (Teste do $\chi^2$ )

VARIÁVEIS QUALITATIVAS	MODALIDADES/CATEGORIAS	
Variável qualitativa 1	Tumor benigno (TB)	Tumor maligno (TM)
Variável qualitativa 2	Simples (S)	Complexo (C)

<b>DADOS</b>	Tabela de Contingência (Tabela das frequências observadas: $O_{i,j}$ , $i = 1,2,\dots,r$ , $j = 1,2,\dots,c$ )			
	$r =$	<b>2</b>	$c =$	<b>2</b>

	S (j=1)	C (j=2)	FM
TB (i=1)	25	22	47
TM (i=2)	163	163	326
FM	188	185	<b>373</b>

FM - Frequências Marginais

**Teste de Hipóteses**

Hipótese nula	$H_0;$	As variáveis qualitativas são independentes
Hipótese alternativa	$H_1;$	As variáveis qualitativas não são independentes

Nível de significância do teste ( $\alpha$ ) = 0,05

Tabela das frequências esperadas:  $E_{ij}, i = 1,2,\dots,r, j = 1,2,\dots,c$

	S (j=1)	C (j=2)	FM
TB (i=1)	23,69	23,31	47,00
TM (i=2)	164,31	161,69	326
FM	188	185	<b>373</b>

Cálculos intermédios								
A) Diferenças			B) Quadrado das diferenças			(Quadrado das diferenças)/Diferenças		
	S(j=1)	C(j=2)		S(j=1)	C(j=2)		S(j=1)	C(j=2)
TB (i=1)	1,31	-1,31	TB (i=1)	1,72	1,72	TB (i=1)	0,07	0,07
TM (i=2)	-1,31	1,31	TM (i=2)	1,72	1,72	TM (i=2)	0,01	0,01

RESUMO DO TESTE		
Valor calculado da estatística ( $\chi^2_{\text{obs}}$ ):	<b>0,17</b>	
Graus de liberdade ((r-1)*(c-1)):	<b>1</b>	
Valor crítico da estatística:	<b>3,841459</b>	Valor calculado da estatística menor que valor crítico
Valor p (p-value):	<b>0,682458</b>	Valor p (p-value) maior que nível de significância
<b>Conclusão do teste de hipótese:</b>	<b>Não rejeitar a Hipótese Nula (falta de evidência experimental)</b>	

## 2. Felídeos domésticos

## 2.1. Idade

### Teste de Independência de duas variáveis qualitativas (Teste do $\chi^2$ )

VARIÁVEIS QUALITATIVAS	MODALIDADES/CATEGORIAS		
Escalões Etários	Escalão Etário 1 (ET <sub>1</sub> )	Escalão Etário 2 (ET <sub>2</sub> )	Escalão Etário 3 (ET <sub>3</sub> )
Variável qualitativa 2	Tumor maligno (TM)	Tumor benigno (TB)	

**DADOS** Tabela de Contingência (Tabela das frequências observadas:  $O_{i,j}$ ,  $i = 1, 2, \dots, r$ ,  $j = 1, 2, \dots, c$ )

$r =$	<b>3</b>	$c =$	<b>2</b>
-------	----------	-------	----------

	TM (j=1)	TB (j=2)	Total
ET <sub>1</sub> (i=1)	24	0	24
ET <sub>2</sub> (i=2)	111	5	116
ET <sub>3</sub> (i=3)	37	0	37
Total	172	5	<b>177</b>

Total - Frequências absolutas marginais

### Teste de Hipóteses

Hipótese nula	$H_0;$	As variáveis qualitativas são independentes
Hipótese alternativa	$H_1;$	As variáveis qualitativas não são independentes

Nível de significância do teste ( $\alpha$ ) = **0,05**

Tabela das frequências esperadas:  $E_{i,j}$ ,  $i = 1, 2, \dots, r$ ,  $j = 1, 2, \dots, c$ )

	TM (j=1)	TB (j=2)	Total
ET <sub>1</sub> (i=1)	23,32	0,68	24,00
ET <sub>2</sub> (i=2)	112,72	3,28	116,00
ET <sub>3</sub> (i=3)	35,95	1,05	37,00
Total	172,00	5,00	<b>177,00</b>

Cálculos intermédios		
A) Diferenças: $D_{ij} = O_{ij} - E_{ij}$	B) Quadrado das diferenças: $(D_{ij})^2$	C) Quadrado das diferenças: $(D_{ij})^2/E_{ij}$

	TM (j=1)	TB (j=2)		TM (j=1)	TB (j=2)		TM (j=1)	TB (j=2)
ET <sub>1</sub> (i=1)	0,68	-0,68	ET <sub>1</sub> (i=1)	0,46	0,46	ET <sub>1</sub> (i=1)	0,02	0,68
ET <sub>2</sub> (i=2)	-1,72	1,72	ET <sub>2</sub> (i=2)	2,97	2,97	ET <sub>2</sub> (i=2)	0,03	0,91
ET <sub>3</sub> (i=3)	1,05	-1,05	ET <sub>3</sub> (i=3)	1,09	1,09	ET <sub>3</sub> (i=3)	0,03	1,05

### RESUMO DO TESTE

Valor calculado da estatística $(\chi^2_{obs})$ :	<b>2,71</b>	
Graus de liberdade $((r-1)*(c-1))$ :	<b>2</b>	
Valor crítico da estatística:	<b>5,991465</b>	Valor calculado da estatística menor que valor crítico
Valor p (p-value):	<b>0,258497</b>	Valor p (p-value) maior que nível de significância
<b>Conclusão do teste de hipótese:</b>	<b>Não rejeitar a Hipótese Nula (falta de evidência experimental)</b>	

Nota: ET1: ≤4 a 7-8 anos; ET2: 8-9 a 12-13 anos; ET3: 13-14 a ≥ 16 anos

## 2.2. Misto/não misto

### Teste de Independência de duas variáveis qualitativas (Teste do $\chi^2$ )

VARIÁVEIS QUALITATIVAS	MODALIDADES/CATEGORIAS	
Variável qualitativa 1	Misto (M)	Não misto (NM)
Variável qualitativa 2	Tumor maligno (TM)	Tumor benigno (TB)

<b>DADOS</b>	<b>Tabela de Contingência (Tabela das frequências observadas: <math>O_{ij}</math>, <math>i = 1, 2, \dots, r</math>, <math>j = 1, 2, \dots, c</math>)</b>			
	$r =$	<b>2</b>	$c =$	<b>2</b>

	TM (j=1)	TB (j=2)	FM
M (i=1)	5	0	5
NM (i=2)	186	6	192
FM	191	6	<b>197</b>

FM - Frequências Marginais

**Teste de Hipóteses**

Hipótese nula	$H_0;$	<b>As variáveis qualitativas são independentes</b>
Hipótese alternativa	$H_1;$	<b>As variáveis qualitativas não são independentes</b>

Nível de significância do teste ( $\alpha$ ) = **0,05**

**Tabela das frequências esperadas:  $E_{i,j}$ ,  $i = 1,2,\dots,r$ ,  $j = 1,2,\dots,c$**

	TM (j=1)	TB (j=2)	FM
M (i=1)	4,85	0,15	5,00
NM (i=2)	186,15	5,85	192
FM	191	6	<b>197</b>

Cálculos intermédios								
A) Diferenças			B) Quadrado das diferenças			(Quadrado das diferenças)/Diferenças		
	TM (j=1)	TB (j=2)		TM (j=1)	TB (j=2)		TM (j=1)	TB (j=2)
M (i=1)	0,15	-0,15	M (i=1)	0,02	0,02	M (i=1)	0,00	0,15
NM (i=2)	-0,15	0,15	NM (i=2)	0,02	0,02	NM (i=2)	0,00	0,00

RESUMO DO TESTE		
Valor calculado da estatística ( $\chi^2_{\text{obs}}$ ):	<b>0,16</b>	
Graus de liberdade $((r-1)*(c-1))$ :	<b>1</b>	
Valor crítico da estatística:	<b>3,841459</b>	Valor calculado da estatística menor que valor crítico
Valor p (p-value):	<b>0,688092</b>	Valor p (p-value) maior que nível de significância
<b>Conclusão do teste de hipótese:</b>	<b>Não rejeitar a Hipótese Nula (falta de evidência experimental)</b>	

## 2.3. Mamas afectadas

### Teste de Independência de duas variáveis qualitativas (Teste do $\chi^2$ )

VARIÁVEIS QUALITATIVAS	MODALIDADES/CATEGORIAS		
Mamas afectadas	Mama 1 (M1)	Mama 2 (M2)	Mamas 3-5 (M3-5)
Variável qualitativa 2	Tumor maligno (TM)	Tumor benigno (TB)	

<b>DADOS</b>	<b>Tabela de Contingência</b> (Tabela das frequências observadas: $O_{i,j}$ , $i = 1, 2, \dots, r$ , $j = 1, 2, \dots, c$ )			
	$r =$	<b>3</b>	$c =$	<b>2</b>

	TM (j=1)	TB (j=2)	Total
M1 (i=1)	103	2	105
M2 (i=2)	32	3	35
M3-5 (i=3)	17	0	17
Total	152	5	<b>157</b>

**Total** - Frequências absolutas marginais

#### Teste de Hipóteses

Hipótese nula	$H_0$ ;	<b>As variáveis qualitativas são independentes</b>
Hipótese alternativa	$H_1$ ;	<b>As variáveis qualitativas não são independentes</b>

Nível de significância do teste ( $\alpha$ ) = 0,05

**Tabela das frequências esperadas:  $E_{i,j}$ ,  $i = 1, 2, \dots, r$ ,  $j = 1, 2, \dots, c$**

	TM (j=1)	TB (j=2)	Total
M1 (i=1)	101,66	3,34	105,00
M2 (i=2)	33,89	1,11	35,00
M3-5 (i=3)	16,46	0,54	17,00
Total	152,00	5,00	<b>157,00</b>



### Teste de Hipóteses

Hipótese nula	$H_0$ ;	As variáveis qualitativas são independentes
Hipótese alternativa	$H_1$ ;	As variáveis qualitativas não são independentes

Nível de significância do teste ( $\alpha$ ) = 0,05

Tabela das frequências esperadas:  $E_{i,j}$ ,  $i = 1, 2, \dots, r$ ,  $j = 1, 2, \dots, c$

	TM (j=1)	TB (j=2)	FM
OVH (i=1)	74,49	2,51	77,00
I (i=2)	103,51	3,49	107
FM	178	6	184

Cálculos intermédios								
A) Diferenças			B) Quadrado das diferenças			(Quadrado das diferenças)/Diferenças		
	TM (j=1)	TB (j=2)		TM (j=1)	TB (j=2)		TM (j=1)	TB (j=2)
OVH (i=1)	0,51	-0,51	OVH (i=1)	0,26	0,26	OVH (i=1)	0,00	0,10
I (i=2)	-0,51	0,51	I (i=2)	0,26	0,26	I (i=2)	0,00	0,07

RESUMO DO TESTE		
Valor calculado da estatística ( $\chi^2_{\text{obs}}$ ):	<b>0,18</b>	
Graus de liberdade $((r-1)*(c-1))$ :	<b>1</b>	
Valor crítico da estatística:	<b>3,841459</b>	Valor calculado da estatística menor que valor crítico
Valor p (p-value):	<b>0,667307</b>	Valor p (p-value) maior que nível de significância
<b>Conclusão do teste de hipótese:</b>	<b>Não rejeitar a Hipótese Nula (falta de evidência experimental)</b>	

## 2.5. Fêmeas OVH/Inteiras; tumor mamário/ outras lesões

**Teste de Independência de duas variáveis qualitativas (Teste do  $\chi^2$ )**

VARIÁVEIS QUALITATIVAS	MODALIDADES/CATEGORIAS	
Variável qualitativa 1	Ovario-histerectomizadas (H)	Inteiras (I)
Variável qualitativa 2	Tumor mamário (T)	Outras lesões (OL)

<b>DADOS</b>	Tabela de Contingência (Tabela das frequências observadas: $O_{i,j}$ , $i = 1,2,\dots,r$ , $j = 1,2,\dots,c$ )			
	$r =$	<b>2</b>	$c =$	<b>2</b>

	T (j=1)	OL (j=2)	FM
OVH (i=1)	77	10	87
I (i=2)	107	19	126
FM	184	29	<b>213</b>

FM - Frequências Marginais

**Teste de Hipóteses**

Hipótese nula	$H_0$ ;	<b>As variáveis qualitativas são independentes</b>
Hipótese alternativa	$H_1$ ;	<b>As variáveis qualitativas não são independentes</b>

Nível de significância do teste ( $\alpha$ ) = **0,05**Tabela das frequências esperadas:  $E_{i,j}$ ,  $i = 1,2,\dots,r$ ,  $j = 1,2,\dots,c$ 

	T (j=1)	OL (j=2)	FM
OVH (i=1)	75,15	11,85	87,00
I (i=2)	108,85	17,15	126
FM	184	29	<b>213</b>

Cálculos intermédios								
A) Diferenças			B) Quadrado das diferenças			(Quadrado das diferenças)/Diferenças		
	T(j=1)	OL (j=2)		T (j=1)	OL (j=2)		T (j=1)	OL (j=2)
OVH (i=1)	1,85	-1,85	OVH (i=1)	3,40	3,40	OVH (i=1)	0,05	0,29
I (i=2)	-1,85	1,85	I (i=2)	3,40	3,40	I (i=2)	0,03	0,20

RESUMO DO TESTE		
Valor calculado da estatística ( $\chi^2_{\text{obs}}$ ):	<b>0,56</b>	
Graus de liberdade ((r-1)*(c-1)):	<b>1</b>	
Valor crítico da estatística:	<b>3,841459</b>	Valor calculado da estatística menor que valor crítico
Valor p (p-value):	<b>0,453288</b>	Valor p (p-value) maior que nível de significância
<b>Conclusão do teste de hipótese:</b>	<b>Não rejeitar a Hipótese Nula (falta de evidência experimental)</b>	

**Anexo II - Informações adicionais (Estatística do teste de Qui-quadrado)**

**Estatística do teste :** 
$$\chi_{obs}^2 = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^c \frac{(O_{i,j} - E_{i,j})^2}{E_{i,j}},$$

com  $E_{i,j}$ ,  $i=1,2,\dots,r$ ,  $j=1,2,\dots,c$  as frequências esperadas no caso de a hipótese nula ser verdadeira.

As frequências absolutas esperadas  $E_{i,j}$ ,  $i=1,2,\dots,r$ ,  $j=1,2,\dots,c$ , são calculadas pela fórmula

$$E_{i,j} = np_i p_j, \quad i=1,2,\dots,r, j=1,2,\dots,c$$

onde

$n$  é o número total de observações,

$p_i$ , ( $i=1,2,\dots,r$ ), é a frequência relativa marginal (probabilidade) da modalidade  $i$  da variável qualitativa 1 calculada pela fórmula

$$p_i = \frac{\sum_{j=1}^c O_{i,j}}{n}, \quad i=1,2,\dots,r$$

e

$p_j$ , ( $j=1,2,\dots,c$ ), é a frequência relativa marginal (probabilidade) da modalidade  $j$  da variável qualitativa 2, calculada pela fórmula

$$p_j = \frac{\sum_{i=1}^r O_{i,j}}{n}, \quad j=1,2,\dots,c$$

**Anexo III** - Informações adicionais (Protocolos)

1. Protocolo de processamento do material e inclusão em parafina (com tempo de duração das fases de processamento)

O material fixado em formaldeído a 3,7% foi incluído em parafina, de acordo com o seguinte protocolo:

- 1) Álcool etílico 70° – 1:00h
- 2) Álcool etílico 95° – 1:30h
- 3) Álcool etílico 95° – 1:30h
- 4) Álcool etílico absoluto – 1:00h
- 5) Álcool etílico absoluto – 1:30h
- 6) Álcool etílico absoluto – 1:30h
- 7) Xilol – 1:00h
- 8) Xilol – 1:00h
- 9) Xilol – 1:00h
- 10) Inclusão em Histosec (Merck- Ref. K91270209) a 65°C – 2:00h
- 11) Inclusão em Histosec a 65°C – 2:00h

Legenda: h - hora

## 2. Protocolo da técnica de coloração Hematoxilina & Eritrosina

- 1) Xilol, 15 min
- 2) Passar 3 vezes em álcool etílico absoluto
- 3) Passar 3 vezes em álcool etílico 90°
- 4) Passar 3 vezes em Álcool etílico 70°
- 5) Lavar bem em água destilada
- 6) Hematoxilina de Ehrlich, 10 min
- 7) Passar 1 vez em água destilada
- 8) Álcool clorídrico 1% em álcool a 70°, 1 passagem
- 9) Água destilada, 1 passagem
- 10) Água comum até escurecer, cerca de 2 min
- 11) Eritrosina, 2 min
- 12) Uma passagem em água destilada
- 13) Álcool etílico 70°, 3 passagens
- 14) Álcool etílico a 90°, 3 passagens
- 15) Álcool absoluto, 5 min
- 16) Xilol, 5 min
- 17) Montagem em resina sintética (Entellan)

Legenda: min – minutos

**Anexo IV** - Informações adicionais (Registo das 21 raças mais frequentes de 2009; Clube Português de Canicultura).

<b>Raça</b>	<b>Número total de animais registados</b>
Labrador Retriever	2789
Cão de Pastor Alemão	1775
Yorkshire Terrier	1640
Golden Retriever	1035
Pinscher Minuatura	635
Chihuahua	607
Rottweiler	530
Cão da Serra da Estrela	530
Podengo Português	472
Dogue Alemão	434
Epagneul Bretão	428
Boxer	371
Spitz Alemão	363
Braco Alemão de Pêlo Curto	317
Bouledogue Francês	298
Shih Tzu	290
Cão de Gado Transmontano	280
Baixote	278
Beagle	274
Setter Inglês	263
Cocker Spaniel Inglês	254