

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

METÁSTASES DE CARCINOMAS MAMÁRIOS EM
LINFONODOS DE CADELAS: VARIÁVEIS CLÍNICO-
PATOLÓGICAS E ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO

Arlinda Flores Coletó

Médica Veterinária

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS - BRASIL
Agosto de 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

METÁSTASES DE CARCINOMAS MAMÁRIOS EM
LINFONODOS DE CADELAS: VARIÁVEIS CLÍNICO-
PATOLÓGICAS E ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO

Arlinda Flores Coletó

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária - UFU, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias (Saúde Animal).

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS - BRASIL
Agosto de 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Sistema de Bibliotecas da
UFU, MG, Brasil.

C694m Coleto, Arlinda Flores, 1987-

2017 Metástases de carcinomas mamários em linfonodos de cadelas : variáveis clínico-patológicas e
estudo imunohistoquímico / Arlinda Flores Coleto. - 2017.

53 f. : il.

Orientador: Alessandra Aparecida Medeiros.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias.

Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Mamas - Cancer - Teses. 3. Imunohistoquímica - Teses. 4.
Metastase - Teses. I. Medeiros, Alessandra Aparecida. II. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Arlinda Flores Coleto – Nascida em Uberlândia (MG), em 27 de setembro de 1987. Graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Uberlândia - UFU (2012). Residência Médico - Veterinária (Patologia Animal) na Universidade Federal de Uberlândia - UFU (2013-2015). Tem experiência em Medicina Veterinária, com ênfase em Patologia Animal.

Só é lutador quem sabe lutar consigo mesmo.

Carlos Drummond de Andrade.

*À DEUS que me deu a vida e, ao
Victor por dar novo sentido a ela.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a meus pais que dedicam amor, tempo, dinheiro e esforços para a realização dos meus sonhos.

À minha irmã Amanda que sempre está do meu lado em todos os acontecimentos da minha vida, sejam eles felizes ou tristes.

À professora Alessandra por todos os ensinamentos que levarei para a vida e pelo exemplo de paciência, persistência, otimismo e sabedoria.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida.

À todas as pessoas que verdadeiramente torcem por mim, me incentivam e admiram, elas sabem quem são.

À minha família que, apesar de pequena e dispersa, são parte importante da minha vida e conquistas e a quem eu quero causar orgulho.

Ao Benício pelo amor, dedicação e apoio constante.

SUMÁRIO

| | Página |
|---|-----------|
| CAPÍTULO 1 | |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA..... | 2 |
| 2.1 Glândula mamária canina: morfologia e drenagem linfática..... | 2 |
| 2.2 Classificação histológica das neoplasias mamárias caninas..... | 4 |
| 2.3 Graduação histológica..... | 6 |
| 2.4 Transição epitélio – mesênquima e vias de metástase..... | 7 |
| 2.5 Linfonodo..... | 8 |
| 2.6 Estadio (TNM) humano e classificação de células tumorais em linfonodo..... | 8 |
| 2.7 Estadio clínico em cadelas..... | 10 |
| 2.8 Abordagem cirúrgica para exérese de linfonodos..... | 12 |
| 2.9 Técnicas de avaliação de linfonodos para a detecção de depósitos tumorais..... | 13 |
| 2.10 Citoqueratinas e pesquisa de CTI e MicO..... | 14 |
| 2.11 Prognóstico de CTI e MIC em mulheres com câncer de mama..... | 15 |
| 2.12 Prognóstico do status nodal em cadelas portadoras de tumor mamário..... | 17 |
| REFERÊNCIAS..... | 18 |
| CAPÍTULO 2 – Células tumorais isoladas ocultas em linfonodos regionais de cadelas portadoras de carcinomas mamários e seu significado prognóstico..... | 31 |

APÊNDICE

| | |
|--|----|
| 1. Apêndice A – Instruções aos autores para publicação no periódico “ <i>Journal of Comparative Pathology</i> ”..... | 53 |
|--|----|

LISTA DE ABREVIATURAS

AJCC - American Joint Committee On Cancer

CTI – Células tumorais isoladas

HE – Hematoxilina Eosina

IHQ – Imunohistoquímica

LS - Linfonodo sentinel

MAC – Macrometástase

MIC – Micrometástase

OMS – Organização Mundial da Saúde

OSNA - Método de amplificação de ácidos nucléicos de uma etapa

SG – Sobrevida global

SLD – Sobrevida livre de doença

SLDD – Sobrevida livre de doença a distância

TMC - Tumores mamários em cães

TNM – Sistema de estadiamento clínico baseado no tamanho do tumor (T), status do linfonodo (N) e presença de metástase a distância (M)

TABELAS

| | Página |
|--|--------|
| Tabela 1. Classificação histológica dos tumores mamários malignos em cães, por MISDORP et al. (1999) e GOLDSCHMIDT et al. (2017)..... | 5 |
| Tabela 2. Classificação TNM e estadiamento de tumores mamários humanos adaptado de GREENE et al. (2002)..... | 9 |
| Tabela 3. Estadio (TNM) modificado por SORENMO et al. (2011) para tumores mamários caninos..... | 11 |

TABELAS (ARTIGO)

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Localização na cadeia mamária, classificação e grau histológico de 62 carcinomas mamários de cadelas..... | 38 |
| Tabela 2. Frequência de células tumorais isoladas e metástases em linfonodos de cadelas portadoras de carcinomas mamários, detectadas pela técnica de imunohistoquímica, de acordo com o tipo, grau histológico e localização microanatômica..... | 39 |

FIGURAS (ARTIGO)

| | Página |
|---|--------|
| Figura 1. Linfonodo inguinal de cadela portadora de carcinoma tubulopapilar grau I. Células tumorais isoladas localizadas na região subcapsular expressando AE1/AE3. IHQ. Bar, 100 μ m..... | 40 |
| Figura 2. Curva de sobrevida Kaplan-Meier de cadelas com carcinoma mamário sem metástases e com células tumorais isoladas (CTI) em linfonodos regionais: A (ausência de metástase; n = 29; mediana, 921 dias), B (células tumorais isoladas; n = 16). As cadelas com CTI não atingiram a mediana de sobrevivência..... | 40 |

METÁSTASES DE CARCINOMAS MAMÁRIOS EM LINFONODOS DE CADELAS: VARIÁVEIS CLÍNICO-PATOLÓGICAS E ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO

RESUMO

Os tumores mamários caninos (TMC) são o tipo de neoplasia mais comum em cadelas. A presença de metástase em linfonodos regionais é um importante fator prognóstico em cadelas portadoras de carcinomas mamários, porém, o significado clínico de células tumorais isoladas (CTI) ocultas em linfonodos ainda é indefinido. A eficácia da técnica de imunohistoquímica (IHQ) na identificação de CTI e micrometástases ocultas em comparação a técnica convencional de hematoxilina eosina foi avaliada, além da relação entre tamanho tumoral, tipo histológico, grau histológico e presença de metástase. A sobrevida de cadelas portadoras de carcinomas mamários com CTI ocultas também foi avaliada. Fragmentos de carcinoma mamário e linfonodos regionais de 59 cadelas foram avaliados. Lâminas histológicas das amostras foram avaliadas para diagnóstico dos tumores e pesquisa de depósitos tumorais e submetidas ao teste de IHQ com o uso do anticorpo pанcitoqueratina AE1/AE3. Foram detectadas 35,2% de CTI ocultas e 2,8% de micrometástases ocultas pela técnica de IHQ. Houve correlação entre o tamanho do tumor e a presença de metástase para o linfonodo ($p=0,77$). As CTI foram mais frequentemente observadas na região medular (60,7%) e as metástases na região cortical (44,4%). Não houve diferença estatística para sobrevida global pela curva de Kaplan-Meier (Log Rank ($p=0,466$), Breslow ($p=0,171$) e Tarone-Ware ($p=0,253$) entre cadelas com CTI ocultas e cadelas com linfonodos livres. A IHQ é capaz de detectar células tumorais ocultas. Cadelas portadoras de carcinomas mamários com CTI em linfonodo não apresentam menor sobrevida.

Palavras chave: Canino; Tumor mamário; Imunohistoquímica; Metástases; Sobrevida.

METASTASIS OF CARCINOMAS IN LYMPH NODES OF BITCHES: CLINICAL PATHOLOGICAL VARIABLES AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY

ABSTRACT

Canine mammary tumors (CMT) are the most common type of neoplasia in bitches. The presence of metastasis in regional lymph node is an important prognostic factor in bitches with mammary carcinomas. However, the clinical significance of isolated tumor cells (ITC) is still undefined. The efficacy of the Immunohistochemistry (IHC) in the identification of CTI and occult micrometastases in comparison to the conventional Hematoxylin Eosin (HE) technique was evaluated, as well the relation between tumor size, histological type, histological grade and presence of metastasis. Survival of bitches with occult CTIs was also evaluated. Fragments of mammary carcinoma and regional lymph nodes of 59 bitches were evaluated. Histological sections of the samples were evaluated for tumor diagnosis and tumor deposits and submitted to the IHC test using the pan-cytokeratin antibody AE1 / AE3. 35.2% of occult CTIs and 2.8% of occult micrometastases were detected by the IHC technique. There was a correlation between the size of the tumor and the presence of metastasis to the lymph node ($p = 0.77$). CTI were more frequently observed in the medullary region (60.7%) and metastases in the cortical region (44.4%). There was no statistically significant difference for overall survival curve Kaplan-Meier (Log rank ($p = 0.466$), Breslow ($p = 0.171$) and Tarone-Ware ($p = 0.253$) among bitches with occult CTIs and bitches with free lymph nodes. The IHC is able of detecting occult tumor cells. Bitches with mammary carcinomas with ITC in the lymph node do not present lower survival.

Key words: Canine; Breast tumor; Immunohistochemistry; Metastases; Survival.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

A expectativa de vida dos animais de companhia vem aumentando e, com isto, o câncer tem se tornado doença recorrente nestes animais (WITHROW, 2007; MATOS et al., 2012). Em cadelas os tumores mamários são os mais comumente diagnosticados (GOLDSCHMIDT et al., 2017) representando 52% de todas as neoplasias (ALLEN et al., 1986). Nota-se ainda que, nas cadelas, cerca de 50% dos tumores mamários são malignos (MACEWEN & WITHROW, 1996; SORENMO, 2003) e o carcinoma é o tipo histológico mais observado (MISDORP, 2002).

Estes dados justificam o aumento no número de estudos sobre os tumores mamários em cães (TMC) nas últimas décadas, por veterinários oncologistas e patologistas (PEÑA et al., 2014).

Os múltiplos fatores predisponentes dos TMC são: idade, genética, exposição hormonal, castração após o primeiro estro e obesidade (SORENMO et al., 2011) entre outros.

Considerando a importância dos TMC na rotina clínica veterinária, um dos objetos de estudo em TMC tem sido a procura por fatores de prognóstico que auxiliem o clínico veterinário a conhecer a extensão da doença neoplásica e eleger a melhor terapia para cada paciente. Vários fatores têm sido propostos para determinação do prognóstico de cadelas com tumor na glândula mamária, entre eles graduação histológica (GUNDIM et al., 2016) e sistema TNM (OWEN, 1980).

O estadio clínico de cadelas com tumor na glândula mamária utiliza o sistema TNM, proposto pela Organização Mundial de Saúde (OWEN, 1980) para mulheres e adaptado por SORENMO et al. (2013), que considera o tamanho do tumor (T), status do linfonodo regional (N) e presença de metástase distante (M) para classificar o paciente em estadios clínicos. Considerando estas variáveis, estudos demonstraram forte correlação entre tamanho tumoral, presença de metástase em linfonodos e sobrevida do animal (SORENMO et al., 2009; DE ARAÚJO et al., 2015; DONG et al.,

2014). Além disto, em mulheres, o sistema TNM é ainda largamente utilizado como fator prognóstico, apesar de métodos mais modernos, como biomarcadores, estarem disponíveis (ORUCEVIC et al., 2015).

Vários estudos têm sido feitos com o objetivo de se avaliar depósitos tumorais em linfonodos regionais utilizando técnicas alternativas, além da histopatologia com coloração pela hematoxilina e eosina (HE) (HANSEN et al., 2009; NOWIKIEWICZ, 2015).

A técnica de imunohistoquímica (IHQ) tem demonstrado ser uma boa ferramenta na detecção de células tumorais isoladas (CTI) e micrometástases ocultas em linfonodos previamente negativos na técnica rotineira de HE (MATOS et al., 2006). Sabe-se que a presença de metástase está associada a prognóstico clínico com impacto negativo na sobrevida de cadelas (SZCZUBIAL & LOPUSZYNSKI, 2011; DE ARAÚJO et al., 2015; GOLDSCHMIDT et al., 2017). Porém, na literatura veterinária não há estudos prognósticos sobre a significância clínica das CTI (PEÑA et al. 2014) e das micrometástases ocultas (MATOS et al., 2006) e na Medicina Humana ainda é divergente (AHMED et al., 2014). O Objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da técnica de IHQ na pesquisa de CTI e micrometástases ocultas em comparação a técnica convencional de HE, verificar a relação entre tamanho tumoral, tipo histológico, grau histológico e presença de células neoplásicas para o linfonodo e avaliar a sobrevida de cadelas portadoras de carcinomas mamários com CTI ocultas em linfonodo regional.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 GLÂNDULA MAMÁRIA CANINA: MORFOLOGIA E DRENAGEM LINFÁTICA

Somente os mamíferos apresentam a característica de possuírem glândula mamária (SORENMO et al., 2011). Com poucas exceções, as cadelas nascem com cinco pares de glândulas, das quais, dois pares se localizam na região do tórax, dois pares são localizados na região do abdômen e um par se localiza na região inguinal (SILVER, 1966).

Histologicamente, a glândula mamária é formada por duas populações de células: epiteliais e mioepiteliais. As epiteliais são cuboides e formam a porção luminal compondo os ductos maiores, quando dispostas em dupla camada ou ductos menores quando dispostas em camada única. As mioepiteliais são fusiformes e envolvem os ductos. Ambas as porções celulares são justapostas por uma membrana basal. Os alvéolos secretores são compostos por epitélio luminal cuboidal a colunar contendo gotículas de gordura intracelularmente e rodeados por células mioepiteliais em formato de estrelas. Já os alvéolos não secretores são morfologicamente similares aos pequenos ductos (SORENMO et al., 2011).

A estrutura da glândula mamária canina é diferente conforme a fase do ciclo estral. No pró-estro em cadelas pré-puberis, há somente grandes ductos envoltos por denso estroma de tecido conjuntivo interlobular e em cadelas adultas, há presença de ductos interlobulares e alguns pequenos lóbulos envoltos por extensa quantidade de tecido conjuntivo intra e interlobular. No estro, ocorre proliferação de epitélio ductal intralobular e perda de tecido conjuntivo dos lóbulos. Quando a taxa de progesterona está elevada o diestro é precoce e há grande desenvolvimento dos ductos com a formação de lóbulos, porém, quando o diestro é tardio, há secreção pelos alvéolos da extremidade terminal dos ductos intralobulares. Quando o anestro é precoce, os alvéolos pouco secretores estão revestidos por células epiteliais sustentadas por membrana basal proeminente, entretanto, no anestro tardio, a regressão da glândula mamária é mais proeminente (REHM et al., 2007; SANTOS et al., 2010).

Fisiologicamente, a drenagem linfática das glândulas mamárias nos cães ocorre por meio do linfonodo ipsilateral (PEREIRA et al., 2003; PEREIRA et al., 2008). As glândulas torácicas craniais são comumente drenadas pelo linfonodo axilar e as caudais são drenadas exclusivamente pelo linfonodo axilar; as glândulas abdominais craniais são drenadas comumente pelo linfonodo axilar e pelo linfonodo inguinal e as caudais são comumente drenadas pelo linfonodo inguinal; as glândulas inguinais são drenadas somente pelo linfonodo inguinal (PATSIKAS & DESSIRIS, 1996^a; PATSIKAS & DESSIRIS, 1996^b). Quando o animal é portador de uma neoplasia na glândula mamária, a drenagem pode ser alterada (PEREIRA et al., 2003; PEREIRA et al., 2008). As torácicas craniais e caudais neoplásicas passam a ser drenadas adicionalmente pelo linfonodo esternal, a abdominal cranial é auxiliarmente drenada pelo linfonodo ilíaco medial, a abdominal caudal passa a ser adicionalmente drenada

pelo linfonodo axilar e a glândula mamária inguinal passa a ter como gânglios de drenagem complementares o linfonodo poplíteo e os demais linfonodos localizados na face medial do membro posterior (PATSIKAS et al., 2006).

2.2 CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA DAS NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS

A classificação histológica mais utilizada por patologistas veterinários para classificar os TMC foi publicada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) no ano de 1999 (MISDORP et al., 1999). Contudo, recentemente uma nova classificação proposta por GOLDSCHMIDT et al. (2017) tem sido adotada.

As neoplasias podem se originar de células epiteliais e/ou mioepiteliais (denominadas carcinomas), ou ter origem em células mesenquimais (sarcomas) e ainda pode ocorrer dupla proliferação destes componentes, o carcinossarcoma (MISDORP, 2002; GOLDSCHMIDT et al., 2017).

A comparação entre as classificações de MISDORP et al. (1999) e GOLDSCHMIDT et al. (2017) pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação histológica dos tumores mamários malignos em cães, por MISDORP et al. (1999) e GOLDSCHMIDT et al. (2017).

| | MISDORP et al. (1999) | GOLDSCHMIDT et al. (2017) |
|--|--|---|
| 1. Carcinomas - neoplasias epiteliais malignas | Não infiltrante (<i>in situ</i>) Complexo Tubulopapilar | <i>in situ</i> Tipo complexo Tubulopapilar |
| 1.1 Carcinomas simples | Cribiforme Sólido Anaplásico | Cribiforme Cístico-papilar Tubular |
| | | Micropapilar invasivo |
| | | Sólido |

| | | |
|---|---------------------------------------|---|
| | | Comedocarcinoma |
| | Anaplásico | |
| 1.2. Outros carcinomas | | Carcinoma decorrente de adenoma complexo ou tumor misto |
| | | Carcinoma e maligno mioepitelioma |
| | | Carcinoma em tumor misto |
| | Ductal | |
| | | Papilar intraductal |
| | | Carcinoma adenoescamoso |
| | Carcinoma de células fusiformes | Carcinoma de células fusiformes |
| | | - Mioepitelioma maligno |
| | | - Carcinoma de células escamosas-variante de células fusiformes |
| 1.3 Carcinomas - tipos especiais | | - Carcinoma - variante de células fusiformes |
| | Carcinoma de células escamosas | Carcinoma de células escamosas |
| | Carcinoma mucinoso | Carcinoma mucinoso |
| | Carcinoma rico em lipídio | Carcinoma rico em lipídio (secretório) |
| | | Carcinoma inflamatório |
| | | Condrossarcoma |
| | Fibrossarcoma | Fibrossarcoma |
| 2. Sarcomas - neoplasias mesenquimais malignas | | Hemangiossarcoma |
| | Osteossarcoma | Osteossarcoma |
| | Outros sarcomas | Outros sarcomas |
| 3. Tumores mamários mistos malignos | Carcinossarcoma | Carcinossarcoma |
| 4. Outro | Carcinoma ou sarcoma em tumor benigno | |

Os TMC podem ser classificados de acordo com a malignidade. Em ordem crescente de agressividade estão: carcinoma complexo, carcinoma simples e sarcoma (MISDORP & HART, 1976; ELSE & HANNANT, 1979; PARODI et al., 1983). Entre os carcinomas simples observa-se crescente malignidade do carcinoma *in situ*, carcinoma tubulopapilar, carcinoma sólido e carcinoma anaplásico (BOSTOCK, 1975). Levando em consideração a classificação de GOLDSCHMIDT et al. (2017), o carcinoma tubulopapilar é mais agressivo que o carcinoma tubular (GOLDSCHMIDT et al., 2017).

2.3 GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA

ELSTON & ELLIS (1991) discorreram que a análise morfológica dos núcleos das células cancerígenas é fundamental para a graduação histológica da neoplasia mamária e associa-se intimamente com a agressividade do tumor.

O sistema Nottingham, modificado por ELSTON & ELLIS (1991), para graduação de tumores pode ser incorporado na Medicina Veterinária (CASSALI et al., 2014). Neste sistema é possível classificar os carcinomas mamários em grau I, grau II ou grau III a partir de um escore obtido pela observação das seguintes características microscópicas: formação de túbulos (mais de 75%: 1 ponto, entre 10% e 75%: 2 pontos, 10% ou menos: 3 pontos), pleomorfismo nuclear (pequenos e regulares: 1 ponto, moderado aumento com variação: 2 pontos, marcado pleomorfismo com grande variação de forma e tamanho: 3 pontos) e número de mitoses por campo de grande aumento (0-8 mitoses: 1 ponto, 9-16 mitoses: 2 pontos e mais de 17 mitoses: 3 pontos). O tumor será classificado de acordo com a soma dos pontos. Tumor de em grau I com escore de 3 a 5 pontos, grau II de 6 a 7 pontos e grau III de 8 a 9 pontos.

RASOTTO et al. (2012) realizaram um estudo retrospectivo com cadelas portadoras de carcinomas mamários e relataram que a maioria dos carcinomas complexos foram de grau I e II e poucos exibiram invasão linfovascular e metástases para linfonodos. Para os carcinomas tubulopapilares de grau II observaram 90% de invasão linfovascular e 78% de metástases para linfonodos e para os tumores de grau III observaram 83% de invasão linfovascular e 67% de metástases para linfonodos. O grau foi um poderoso fator prognóstico nos carcinomas sólidos, visto que em 100%

dos carcinomas sólidos de grau III foram observadas metástases para linfonodos. Estes autores também relataram que todos os diagnósticos de carcinomas anaplásicos foram grau III com metástases para linfonodos.

2.4 TRANSIÇÃO EPITÉLIO – MESÊNQUIMA E VIAS DE METÁSTASE

Atualmente, a transição epitélio – mesênquima (TEM) tem sido estudada e discutida como responsável pelo mecanismo de metástases de células cancerígenas. O evento mais importante que ocorre na TEM é a perda da expressão de E-caderina pelas células (WELLS et al., 2008). Esta caderina é responsável pelas ligações intercelulares homotípicas (TAKEICHI, 1991). A perda de expressão desta molécula de adesão faz com que as células epiteliais adquiram fenótipo mesenquimal, se desprendam uma das outras, adquiram forma ameboide e mobilidade, capacidade de disseminação e invasão, levando-as a migrarem para outros tecidos do organismo (TSE & KALLURI, 2007). Sendo assim, os tumores com pouca ou nenhuma expressão de E-caderina geralmente são classificados com maiores graus, são mais infiltrantes e mais propensos a metástases por via linfática (BRUNETTI et al., 2003).

Os TMC utilizam rotas diferentes de disseminação tumoral. Os carcinomas comumente se espalham através da via linfática. Já os sarcomas possuem predileção por capilares e veias, contudo, este mecanismo ainda não está totalmente elucidado. As células tumorais invadem os vasos linfáticos sem dificuldades, uma vez que estes não possuem uma membrana basal. Estas células podem ficar retidas no gânglio, bem como atravessarem ou mesmo se desviarem dos linfonodos e se instalarem em outros órgãos, formando metástases distantes (SORENMO et al., 2011, GOLDSCHMIDT et al., 2017).

2.5 LINFONODO

O linfonodo é um órgão do sistema hemolinfático composto quase exclusivamente por linfócitos. Também são observadas população de células reticulares, macrófagos, células epiteliais cuboides e, por vezes, plasmócitos e linfoblastos. Possui formato semelhante a um grão de feijão, com duas faces: convexa e achatada. (ABRAHAMSOHN, 2008).

É envolto por uma cápsula de tecido conjuntivo que emite trabéculas para o interior do órgão, responsáveis pelo suporte e sustentação, assim como fibras reticulares sintetizadas por células reticulares localizadas logo abaixo da cápsula, no seio subcapsular. Adjacente, observa-se a região cortical, composta por nódulos linfáticos mais evidentemente observados quando em resposta imunológica, denominados, portanto, centros germinativos. Imediatamente abaixo, observa-se a região paracortical. A porção medular é composta por aglomerados de linfócitos, os cordões medulares, envoltos por espaços menos densos, os seios medulares. (ABRAHAMSOHN, 2008).

A drenagem da linfa ocorre através do vaso linfático aferente, cápsula, seio subcapsular, seios peritrabeculares, porção medular, seio medular e vaso eferente (ABRAHAMSOHN, 2008).

2.6 ESTADIO (TNM) HUMANO E CLASSIFICAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS EM LINFONODO

A classificação do sistema TNM humano e o estadio são summarizados na Tabela 2.

Tabela 2. Classificação TNM e estadio de tumores mamários humanos adaptado de GREENE et al. (2002).

| T ^a | N ^a | M ^a | Estadio 0 | Tis | N0 | M0 |
|--------------------------|----------------------|----------------|--------------|-------------|------------|----|
| Tx ^b | NX | MX | Estadio I | T1 ou T1mic | N0 | M0 |
| T0 ^c | N0 | M0 | Estadio IIA | T0 | N1 | M0 |
| Tis ^d | N1 | M1 | | T1 ou T1mic | N1 | M0 |
| Tis (CDIS) ^d | N2 | | | T2 | N0 | M0 |
| Tis (CLIS) ^d | N2a | | Estadio IIB | T2 | N1 | M0 |
| Tis (Paget) ^d | N2b | | | T3 | N0 | M0 |
| T1 | N3 | | Estadio IIIA | T0 | N2 | M0 |
| T1mic ^e | N3a | | | T1 ou T1mic | N2 | M0 |
| T1a | N3b | | | T2 | N2 | M0 |
| T1b | N3c | | | T3 | N1 | M0 |
| T1c | pNX | | | T3 | N2 | M0 |
| T2 | pN0 | | Estadio IIIB | T4 | N0 | M0 |
| T3 | pN0(i+) ^f | | | T4 | N1 | M0 |
| T4 | pNmic ^g | | | T4 | N2 | M0 |
| T4a | pN1 | | Estadio IIIC | Qualquer T | N3 | M0 |
| T4b | pN2 | | Estadio IV | Qualquer T | Qualquer N | M1 |
| pT | pN3 | | | | | |

^aT= Tamanho tumoral, N= Linfonodos regionais, M= Metástase à distância.

^bX=Não pode ser avaliado.

^c0=Não há evidência.

^dTis= Carcinoma *in situ*, Tis (CDIS)= Carcinoma ductal *in situ*, Tis (CLIS)=Carcinoma lobular *in situ*, Tis (Paget)=Doença de Paget do mamilo sem tumor na mama.

^eT1mic= Microinvasão de 0,1 cm ou menos em sua maior dimensão

^fpN0(i+)= Células tumorais isoladas.

^gpNmic=Micrometástase.

Os depósitos tumorais são classificados em CTI quando as células neoplásicas formam aglomerados menores que 0,2 mm, estão dispostas individualmente ou formam aglomerados com menos de 200 células em único corte histológico, detectas

por HE ou IHQ. Não são consideradas verdadeiras metástases. São consideradas micrometástases (MIC) aglomerados de células tumorais entre 0,2 e 2,0 mm e/ou mais de 200 células. Já as MAC são aglomerados de células tumorais maiores que 2,0 mm (GREENE et al., 2002; EDGE et al., 2009).

O AJCC *Cancer Staging Handbook*, que determina os parâmetros para o estadio do paciente oncológico (AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER, 2016), recomenda bom censo do patologista na avaliação de linfonodos em situações duvidosas, como na presença de vários aglomerados celulares em um mesmo linfonodo que podem gerar dúvida se são aglomerados de CTI ou uma MIC difusa, por exemplo. O AJCC descreve que um único aglomerado são células que se tocam (confluentes ou contíguas), porém em alguns casos, recomendam que os patologistas “usem um julgamento” (RABBAN, 2010).

2.7 ESTADIO CLÍNICO EM CADELAS

O TNM é importante para auxiliar o clínico veterinário a conhecer a extensão da lesão (CASSALI et al., 2014), determinar o prognóstico e instituir tratamento adequado (SORENMO et al., 2011).

O estadio clínico de cadelas com tumor na glândula mamária utiliza o sistema TNM, proposto pela Organização Mundial de Saúde (OWEN, 1980) para mulheres e adaptado por SORENMO et al. (2013). Neste sistema a avaliação do animal é baseada nas variáveis tamanho do tumor primário (T), extensão da metástase para linfonodo regional (N) e presença ou não de metástase a distância (OWEN, 1980).

SORENMO et al. (2011) propuseram TNM modificado que considera o tamanho (T) nas categorias T1 (<3 cm), T2 (3-5 cm) ou T3 (>5 cm) baseado no diâmetro do maior tumor.

Quanto à presença de metástase (N) as categorias são N0 (sem metástase) ou N1 (com metástase) (SORENMO et al., 2013). A categoria N1 independe da localização do linfonodo com metástase (ipsilateral ou contralateral), diâmetro da metástase ou exame realizado para o diagnóstico de CTI ou micrometástases ocultas, como a IHQ.

Com relação às metástases à distância, considera-se categoria M0 (sem metástases distantes) ou M1 (com metástases distantes) (SORENMO et al., 2013), avaliada através de exames radiográficos do tórax e/ou ultrassom abdominal (MATOS et al., 2006).

A partir das variáveis TNM, é feito o estadio do paciente (Tabela 3).

Tabela 3. Estadio (TNM) modificado por SORENMO et al. (2011) para tumores mamários caninos.

| Estadio | TNM | | |
|---------|------------------|------------------|------------------|
| | (T) ^a | (N) ^b | (M) ^c |
| I | T1 | N0 | M0 |
| II | T2 | N0 | M0 |
| III | T3 | N0 | M0 |
| IV | Qualquer T | N1 | M0 |
| V | Qualquer T | Qualquer N | M1 |

^aT= Tamanho tumoral.

^bN= Linfonodos regionais.

^cM= Metástase à distância.

PEÑA et al. (2012) observaram associação entre tamanho do tumor, tipo histológico, grau histológico, estadio clínico e sobrevida para cadelas com carcinomas mamários. O tamanho do tumor foi associado ao grau (os tumores foram maiores em neoplasias de grau III em comparação aos de grau I). O tipo histológico foi significativamente associado ao grau (os comedocarcinomas foram de grau III e a maioria dos tumores menos agressivos foram de grau I). O grau histológico foi associado ao estadio clínico (todos os animais com neoplasias de grau I com exceção de um, foram estadiados em estadio I e II) e significativamente associado a recidivas e/ou metástases (a maioria dos tumores foram de grau III). A sobrevida global (SG) foi associada ao grau (as cadelas portadoras de tumor grau III tiveram menor sobrevida) e ao estadio (cadelas estadiadas no estadio IV tiveram menor sobrevida). A sobrevida livre de doença (SLD) foi associada ao grau (as cadelas portadoras de tumor grau III tiveram menor sobrevida) e ao estadio (cadelas estadiadas no estadio IV tiveram menor sobrevida).

GUNDIM et al. (2016) realizaram estadio clínico de cadelas portadoras de tumores mamários, associando com tipo histológico e grau. Cadelas portadoras de carcinomas simples foram mais frequentemente classificadas em estadio I e pouco classificados em estadio V. Foi possível observar também que animais com estadios I, II ou III apresentaram mais frequentemente tumores de grau I, em comparação ao estadio IV e V.

2.8 ABORDAGEM CIRÚRGICA PARA EXÉRESE DE LINFONODOS

Atualmente, a biópsia do linfonodo sentinel (LS) é a técnica padrão para o estadio de mulheres com câncer de mama (ZENG et al., 2015) e foi incorporada na oncologia humana como alternativa à completa retirada do linfonodo axilar (PÉREZ-CALLEJO et al., 2015), uma vez que eram observadas complicações decorrentes da dissecação do linfonodo axilar (não-sentinel), tais como hematomas, linfedema crônico, seroma e infecções (GIULIANO et al., 2000).

Há divergências entre os pesquisadores sobre a abordagem terapêutica de pacientes com câncer em estágios iniciais. Recomenda-se a dissecação axilar em pacientes com diagnóstico definitivo de MIC para LS (PÉREZ-CALLEJO et al., 2015). Entretanto, SHIMAZU & NOGUCHI (2016) discorrem que a biópsia axilar pode ser evitada em mulheres com LS positivos, exceto em diagnóstico de MAC.

Similarmente, há um impasse quanto a abordagem em pacientes com CTI presentes no linfonodo, comprometendo a decisão da realização ou não da biópsia do linfonodo axilar (AHMED et al., 2014). Alguns autores recomendam evitar a dissecação axilar na presença de CTI e/ou MIC em LS (GUENTHER et al., 2003; YEGIYANTS et al., 2010; AHMED et al., 2014).

A exérese de linfonodos em cadelas com tumor na glândula mamária segue padrões diferentes da abordagem realizada em mulheres. Durante a técnica de mastectomia, o linfonodo inguinal é usualmente retirado em bloco com a glândula mamária inguinal afetada (SORENMO et al., 2013; MACPHAIL, 2015) ou mesmo retirado em conjunto com toda a cadeia mamária ipsilateral. Já o linfonodo axilar é retirado somente quando este apresenta alterações macroscópicas como aumento de

volume, mudança na consistência (SORENMO et al., 2013) ou alteração de cor, pois se localizam em região de difícil acesso cirúrgico nos animais.

2.9 TÉCNICAS DE AVALIAÇÃO DE LINFONODOS PARA A DETECÇÃO DE DEPÓSITOS TUMORAIS

Ao longo das décadas várias técnicas têm sido propostas para a detecção de depósitos tumorais em linfonodos, principalmente no caso de neoplasias mamárias.

A coloração de HE é frequentemente utilizada para avaliação e pesquisa de linfonodos (HANSEN et al., 2009; NOWIKIEWICZ, 2015).

Vários estudos têm sido feitos com o objetivo de avaliar depósitos tumorais em linfonodos regionais utilizando técnicas alternativas. A técnica de IHQ tem demonstrado ser uma boa ferramenta na detecção de CTI e micrometástases ocultas de carcinomas em linfonodos previamente negativos na técnica rotineira de HE (MATOS et al., 2006).

Recentemente foi proposto o Método de amplificação de ácidos nucléicos de uma etapa (OSNA), que é um procedimento molecular que utiliza o marcador CK 19 mRNA (TSUJIMOTO et al., 2007; TAMAKI et al., 2009) para detecção de células tumorais no linfonodo (PÉREZ-CALLEJO et al., 2015), uma vez que a citoqueratina 19 (CK 19) é uma proteína do citoesqueleto altamente expressada no câncer de mama (ABD EL-REHIM et al., 2004; SHAO et al., 2012). Pode ser realizado no transoperatório por analisar um linfonodo inteiro em 30 a 40 minutos (TSUJIMOTO et al., 2007; TAMAKI et al., 2009). WANG et al. (2012) avaliaram a acurácia do OSNA em relação ao exame patológico convencional e encontraram 89,1% de acurácia. Para análise de sobrevida, SHIMAZU & NOGUCHI (2016) defendem que o OSNA pode responder as dúvidas quanto ao impacto de mínima metástase para o LS, se usado em uma grande amostra e por um período maior de acompanhamento.

Uma outra técnica, recentemente relatada, é a técnica molecular de separação imunomagnética. Esta demonstrou ser mais economicamente viável e mais rápida em execução, além de maior sensibilidade (86,4%) e acurácia (93,5%) em comparação com as técnicas de HE e IHQ (ZHI et al., 2015).

ZHANG et al. (2015) utilizaram ultrassom na investigação de metástases em linfonodos axilares de mulheres com câncer de mama. A sensibilidade do exame foi de 69,4% e a acurácia foi de 77%. Mais de 30% dos resultados foram falso-negativos e os autores concluíram ser necessário ter cautela ao optarem pelo exame de ultrassom em detrimento a outros exames convencionais.

Para a avaliação de metástases nodais advindas de diferentes carcinomas em cães, HÖINGHAUS et al. (2007) realizaram imunocitoquímica em *imprint* de linfonodos e concluíram que a técnica de imunocitoquímica foi mais sensível que a técnica citológica convencional, sendo mais eficaz na detecção de micrometástases.

BESERRA et al. (2016) utilizou a técnica do LS que consistiu na aplicação do corante Azul Patente V na região peritumoral intradérmica superficial para visualização e localização do linfonodo sentinela em cadelas com carcinomas mamários concluindo que a técnica oferece alta sensibilidade.

2.10 CITOQUERATINAS E PESQUISA DE CTI E MICROMETÁSTASES OCULTAS

Em Medicina Humana, a técnica de IHQ tem transformado drasticamente a forma de identificação e classificação de tumores nas últimas décadas (EYZAGUIRRE & HAQUE, 2008) contribuindo para o direcionamento prognóstico e terapêutico (PAYNE et al., 2008; PUGLIESE et al., 2010).

Desde o início do século XXI vários pesquisadores têm buscado biomarcadores fidedignos no uso da IHQ para o diagnóstico e/ou prognóstico de tumores mamários em cadelas (PEÑA et al., 2014).

As citoqueratinas (CK) são proteínas presentes no epitélio da glândula mamária normal de caninos, felinos e humanos. A camada de células luminais/epiteliais expressa CK de baixo peso molecular incluindo CK7, CK8, CK18 e CK19. A camada de células basais/mioepiteliais expressa CK de alto peso molecular incluindo CK5, CK6, CK14 e CK17 (SORENMO et al., 2011; GOLDSCHMIDT et al., 2017). Esta propriedade de expressão celular se mantém durante a transformação e o desenvolvimento do tumor, portanto, estes marcadores são utilizados para tumores mamários de humanos e caninos.

Para um exame mais sensível e específico pode-se dispor de um “coquetel” constituído por anticorpos anti 20 ou mais queratinas denominado pan-citoqueratina (RAMOS-VARA & BORST, 2017). Estes anticorpos são capazes de diferenciar de forma consistente, células tumorais presentes no linfonodo, possibilitando a detecção de CTI e micrometástases ocultas em linfonodos regionais previamente negativos no exame histopatológico em HE, com o uso do coquetel AE1/AE3 (MATOS et al., 2006; SORENMO et al., 2011; MATOS et.al., 2012). Diversos autores optaram pelo uso do anticorpo anti-pan-citoqueratina AE1/AE3 na avaliação de linfonodos (MATOS et al., 2006; SZCZUBIAI & LOPUSZYNSKI, 2011; AHMED et al., 2014; COELHO et al., 2014; DE ARAÚJO et al., 2015).

Deve-se ter cautela na interpretação da imunomarcação, com o objetivo de diferenciar as células tumorais com outros tipos celulares que porventura possam estar igualmente marcados em castanho, como as células reticulares ceratina-positivas, partículas ceratina-positivas isoladas, além de histiócitos de aspecto granular (DOKI et al., 2002; DOMAGALA et al., 1992).

2.11 PROGNÓSTICO DE CTI E MIC EM MULHERES COM CÂNCER DE MAMA

O status do linfonodo é considerado o fator prognóstico mais importante em mulheres com câncer de mama (PÉREZ-CALLEJO et al., 2015), consequentemente, possui relevantes implicações para o tratamento (ZENG et al., 2015).

Com o avanço da técnica do LS que consiste na minuciosa avaliação dos linfonodos e emprego da IHQ, aglomerados de células tumorais menores que 2,0 mm passaram a ser mais comumente detectados (DE BOER et al., 2010), possibilitando a observação de CTI e micrometástases ocultas.

Atualmente, há vários questionamentos acerca do significado clínico das CTI e das MIC (CSERNI et al., 2003; DE BOER et al., 2010; AHMED et a., 2014; NOWIKIEWICZ et al., 2015). Em diversos estudos, não foram relatados tempos de SG e/ou SLD menores em mulheres com linfonodo micrometastático e/ou na presença de CTI (MILLIS et al., 2002; HANSEN et al., 2009; GOBARDHAN et al., 2011; MAASKANT – BRAAT et al., 2011). AHMED et al. (2014) não observaram menores tempos de SG e SLD em pacientes com CTI e MIC para LS mas defendem a

segregação entre as duas classificações pois sugerem propensão a pior sobrevida na presença de MIC para o linfonodo.

CUMMINGS et al. (2002) relataram diminuição na SLD em pacientes com aglomerados tumorais maiores que 0,5 mm advindos de carcinomas ductais invasivos. REED et al. (2004), relataram menores tempos de SG em pacientes jovens com aglomerados tumorais de até 0,2 mm.

De acordo com o *National Cancer Data Base*, a SG diminuiu até 6% em 10 anos para pacientes com MIC, em comparação com pacientes linfonodo-negativo (CHEN et al. 2007). DE BOER et al. (2009) relataram diminuição em 5 anos na SLD em mulheres com MIC e CTI que não receberam tratamento adjuvante. PARK et al. (2009) relataram que MIC para linfonodos axilares apresentaram tendência a menor SLD, SLDD, além de significativa redução da sobrevida específica para o câncer de mama, não observando o mesmo para CTI.

DE BOER et al. (2010) realizaram revisão de artigos para avaliar a relevância prognóstica de CTI e MIC. Nos estudos de coorte, que englobaram estudos anteriores a recente classificação de CTI pelo AJCC, observou-se menores tempos de SG em pacientes com aglomerados tumorais de 2,0 mm ou menos baseado em estudos de avaliação de linfonodos axilares em único corte histológico corado em HE.

ANDERSSON et al. (2010) relataram menor tempo de SG e SLD em mulheres com linfonodos micrometastáticos quando comparadas a mulheres sem linfonodos afetados e pacientes com CTI. WEAVER et al. (2011) não observaram diferença significativa nas estimativas de SG para 5 anos em pacientes com metástases (94,6%) e sem metástases (95,8%) para o linfonodo e não recomendam avaliação adicional de LS previamente negativos, apesar da diminuição da SG, SLD e SLDD em pacientes com micrometastases ocultas.

SHIMAZU & NOGUCHI (2016) e DE BOER et al. (2010) discorreram não ser possível determinar o prognóstico baseado em estudos de pesquisa de micrometastases ocultas com o uso de secções seriadas de linfonodos e/ou IHQ, visto que não há padronização de uma técnica para avaliação de linfonodos de pacientes com câncer de mama, além de curto tempo de acompanhamento e avaliação de poucos indivíduos.

2.12 PROGNÓSTICO DO STATUS NODAL EM CADELAS PORTADORAS DE TUMOR MAMÁRIO

O status do linfonodo possui fundamental papel no prognóstico de diversas neoplasias malignas em cães (SORENMO et al., 2011; SZCZUBIAL & LOPUSZYNSKI, 2011; STROMBERG & MEUTEN, 2017).

KURZMAN & GILBERTSON (1986) realizaram um grande estudo retrospectivo, selecionando cadelas com diagnóstico de carcinoma mamário que já haviam passado por cirurgia prévia com retirada dos linfonodos e usaram a recorrência do tumor como ponto final para o acompanhamento. Estes autores concluíram que cadelas com metástases para o linfonodo tiveram menor SLD.

YAMAGAMI et al. (1996), relataram que a taxa de sobrevida no período de dois anos pós-cirurgia foi substancialmente menor em cadelas com linfonodos afetados. DE LAS MULAS et al. (2005) verificaram que o status do linfonodo com metástase influenciou o menor tempo de SLD em análise univariada, contudo, não foi observado influência em análise multivariada.

SZCZUBIAL & LOPUSZYNSKI (2011) relataram menores tempos de SG e SLD em cadelas com MAC. SANTOS et al. (2013) observaram significativa diminuição nos tempos de SG e SLD em cadelas com linfonodos regionais metastáticos, sem especificar qual tipo de metástase. DE ARAÚJO et al. (2015) associaram linfonodos com MAC com menor tempo de sobrevida. GOLDSCHMIDT et al. (2017) descreveram associação entre menor tempo de SG com ambos critérios, invasão linfovascular e metástase para o linfonodo.

SZCZUBIAL & LOPUSZYNSKI, (2011) não encontraram diferença estatística na sobrevida de cadelas com MIC para o linfonodo regional. DE ARAÚJO et al. (2015) observaram que linfonodos com CTI significaram menor tempo de sobrevida, contudo não observaram para cadelas com linfonodos micrometastáticos.

Estudos prospectivos que utilizem maior número de animais e padronização de técnicas são necessários para estabelecer prognósticos mais confiáveis na análise do status do linfonodo.

REFERÊNCIAS

ABD EL-REHIM, D. M.; PINDER, S. E.; PAISH, C. E.; BELL, J.; BLAMEY, R. W.; ROBERTSON, J. F., NICHOLSON, R.H., ELLIS, I. O. Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. **The Journal of Pathology**. v. 203, n. 2, p. 661-671, 2004.

ABRAHAMSOHN, P. **MOL. Microscopia On Line. Seu guia interativo de Histologia.** 2008. <<http://www.icb.usp.br/mol/12-7-linfoides-LN-1.html>>. Acesso em: 12 jan. 2017.

AHMED, S. S.; THIKE, A. A.; IQBAL, J.; YONG, W. S.; TAN, B.; MADHUKUMAR, P.; ONG, K. W.; HO, G. H.; WONG, C. Y.; TAN, H. P. Sentinel lymph nodes with isolated tumour cells and micrometastases in breast cancer: Clinical relevance and prognostic significance. **Journal of Clinical Pathology**, v. 67, n. 3, p. 243-250, 2014.

ALLEN, S. W.; PRASSE, K. W.; MAHAFFEY, E. A. Cytologic differentiation of benign from malignant canine mammary tumors. **Veterinary pathology**. v. 23, n. 6, p. 649-655, 1986.

AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER. **What is the AJCC?** 2016. <<https://cancerstaging.org/About/what-is-the-ajcc/Pages/whatisajcc.aspx>>. Acesso em: 03 mar. 2016.

ANDERSSON, Y.; FRISELL, J.; SYLVAN, M.; DE BONIFACE, J.; BERGKVIST, L. Breast cancer survival in relation to the metastatic tumor burden in axillary lymph nodes. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 17, p. 2868–2873, 2010.

BESERRA, H. E. O.; GRANDI, F.; DUFLOTH, R. M.; PINHEIRO, L. G. P, MIOT, H. A.; SVEXENAT, S. C. O. R.; ROCHA, N. S. Metastasis of Mammary Carcinoma in Bitches: Evaluation of the Sentinel Lymph Node Technique. **Advances in Breast Cancer Research**, v. 5, n. 2. p. 58-65, 2016.

BOSTOCK, D. E. The prognosis following the surgical excision of canine mammary neoplasms. **European Journal of Cancer**. v. 11, n. 6, p. 389-396, 1975.

BRUNETTI, B.; SARLI, G.; PREZIOSI, R.; LEPROTTI, S.; BENAZZI, C. E-cadherin Expression in Canine Mammary Carcinomas with Regional Lymph Node Metastases. **Journal of Veterinary Medicine Series A**. v. 50, n. 10, p. 496–500, 2003.

CASSALI, G. D.; LAVALLE, G. E.; FERREIRA, E.; ESTRELA-LIMA, A.; DE NARDI, A. B.; GHEVER, C.; SOBRAL, R. A.; AMORIM, R .L.; OLIVEIRA, L. O.; SUEIRO, F. A. R.; BESERRA, H. E. O.; BERTAGNOLLI, A. C.; GAMBA, C. O.; DAMASCENO, K. A.; CAMPOS, C. B.; ARAUJO, M. R.; CAMPOS, L. C.; MONTEIRO, L. N.; NUNES, F. C.; HORTA, R. S.; REIS, D. C.; LUVIZOTTO, M. C. R.; MAGALHÃES, G. M.; RAPOSO, J. B.; FERREIRA, A. M. R.; TANAKA, N. M.; GRANDI, F.; UBUKATA, R.; BATSCHEINSKI, K.; TERRA, E. M.; SALVADOR, R. C. L.; JARK, P. C.; DELECRODI, J. E. R.; NASCIMENTO, N. A.; SILVA, D. N.; SILVA, L. P.; FERREIRA, K. C. R. S.; FREHSE, M. S.; DI SANTIS, G. W.; SILVA, E. O.; GUIM, T. N.; KERR, B.; CINTRA, P. P.; SILVA, F. B. F.; LEITE, J. S., MELLO, M. F. V.; FERREIRA, M. L. G.; FUKUMASU, H.; SALGADO, B. S.; TORRES, R. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors – 2013. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 7, n. 2, p. 38 – 69, 2014.

CHEN, S. L, HOEHNE, F. M, GIULIANO, A. E. The prognostic significance of micrometastases in breast cancer: a SEER population-based analysis. **Annals of Surgical Oncology**. v. 14, n . 12, p. 3378–3384, 2007.

COELHO, V. S. **Abordagem imuno-histoquímica otimiza a identificação de micrometástases nodais em cães portadores de carcinomas mamários**. 2014. 46F. Dissertação (Mestrado em Patologia Ambiental e Experimental) - Universidade Paulista - UNIP, São Paulo, 2014.

CSERNI, G.; AMENDOEIRA, I.; APOSTOLIKAS, N.; BELLOCQ, J. P.; BIANCHI, S.; BUSSOLATI, G.; BOECKER, W.; BORISCH, B.; CONNOLLY, C. E. DECKER, T.; DERVAN, P.; DRIJKONINGEN, M.; ELLIS, I.O.; ELSTON, C.W.; EUSEBI, V.;

FAVERLY, D.; HEIKKILA, P.; HOLLAND, R.; KERNER, H.; KULKA, J.; JACQUEMIER, J.; LACERDA, M.; MARTINEZ-PENUELA, J.; DE MIGUEL, C.; PETERSE, J. L.; RANK, F.; REGITNIG, P.; REINER, A.; SAPINO, A.; SIGAL-ZAFRANI, B.; TANOUS, A. M.; THORSTENSON, S.; ZOZAYA, E.; WELLS, C. A. Pathological work-up of sentinel lymph nodes in breast cancer. Review of current data to be considered for the formulation of guidelines. **European Journal of Cancer**, v. 39, n. 12, p. 1654–1667, 2003.

CUMMINGS, M. C.; WALSH, M. D.; HOHN, B. G.; BENNETT, I. C.; WRIGHT, R. G.; MCGUCKIN, M. A. Occult axillary lymph node metastases in breast cancer do matter: results of 10-year survival analysis. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 26, n. 10, p. 1286–95, 2002.

DE ARAÚJO, M. R.; CAMPOS, L. C.; FERREIRA, E.; CASSALI, G. D. Quantitation of the Regional Lymph Node Metastatic Burden and Prognosis in Malignant Mammary Tumors of Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 5, p. 1360-1367, 2015.

DE BOER, M.; VAN DEURZEN, C. H. M.; VAN DIJCK, J. A. A. M.; BORM, G. F.; VAN DIEST, P. J.; ADANG, E. M. M.; NORTIER, J. W. R.; RUTGERS, E. J. T.; SEYNAEVE, C.; MENKE-PLUYMERS, M. B. E.; BULT, P.; TJAN-HEIJNEN, V. C. G. Micrometastases or isolated tumor cells and the outcome of breast cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 7, p. 653–63, 2009.

DE BOER, M.; VAN DIJCK, J. A. A. M.; BULT, P.; BORM, F.; TJAN-HEIJNEN, V. C. G. Breast Cancer Prognosis and Occult Lymph Node Metastases, Isolated Tumor Cells, and Micrometastases, **Journal Of The National Cancer Institute**, v. 102, n. 6, p. 410-425, 2010.

DE LAS MULAS, J. M.; MILLÁN, Y.; DIOS, R. 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. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 2, p. 200–212, 2005.

DOKI, Y.; ISHIKAWA, M., MANO, M.; HIRATSUKA, M.; SASAKI, Y.; KAMEYAMA, M.; OHIGASHI, H.; MURATA, K.; YAMADA, T.; MIYASHIRO, I.; YOKOYAMA, S.; ISHIGURO, S.; IMAOKA, S. Cytokeratin deposits in lymph nodes show distinct clinical significance from lymph node micrometastasis in human esophageal cancers. **Journal of Surgical Research.** v. 107, n. 1, p. 75-81, 2002.

DOMAGALA, W.; BEDNER, E.; CHOSIA, M.; WEBER, K.; OSBORN, M. Keratin-positive reticulum cells in fine needle aspirates and touch imprints of hyperplastic lymph nodes. A possible pitfall in the immunocytochemical diagnosis of metastatic carcinoma. **Acta Cytologica.** v. 36, n. 2, p. 241-245, 1992.

DONG, G.; WANG, D.; LIANG, X.; GAO, H.; WANG, L.; YU, X.; LIU, J. Factors related to survival rates for breast cancer patients. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine.** v. 7. n. 10, p. 3719–3724, 2014.

EDGE, S. B.; BYRD, D. R.; CARDUCCI, M. A.; COMPTON, C. C.; FRITZ, A. G.; GREENE, F.; TROTTI, A. **Cancer Staging Manual.** American Joint Committee on Cancer (AJCC). 7. ed. New York: Springer, 2009, 648p.

ELSE, R.W.; HANNANT, D. Some epidemiological aspects of mammary neoplasia in the bitch. **Veterinary Record.** v. 104. n. 14. p. 296-304, 1979.

ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**, v. 19, n. 5, p. 403-410, 1991.

EYZAGUIRRE, E.; HAQUE, A. K. Application of immunohistochemistry to infections. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine Online.** v. 132. n. 3, p. 424–431, 2008.

GIULIANO, A. E.; HAIG, P. I.; BRENNAN, M. B.; HANSEN, N. M.; KELLEY, M. C.; YE, W.; GLASS, E. C.; TURNER, R. R. Prospective observational study of sentinel

lymphadenectomy without further axillary dissection in patients with sentinel lymph node-negative breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**. v. 18, n. 13, p. 2553–2559, 2000.

GOBARDHAN, P. D.; ELIAS, S. G.; MADSEN, E. V.; VAN WELY, B.; VAN DEN WILDENBERG, F.; THEUNISSEN, E. B.; ERNST, M. F.; KOKKE, M. C.; VAN DER POL, C.; RINKES, I. H. M. B.; WIJSMAN, J. H.; BONGERS, V.; VAN GORP, J.; VAN DALEN, T. Prognostic value of lymph node micrometastases in breast cancer: a multicenter cohort study. **Annals of Surgical Oncology**. v. 18, n. 6, p. 1657–1664, 2011.

GOLDSCHMIDT, M. H.; PEÑA, L.; ZAPPULLI, V. Tumors of the Mammary Gland. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in Domestic Animals**. 5. ed. Wiley Blackwell, 2017, 996p.

GREENE, F. L.; PAGE, D. L.; FLEMING, I. D.; FRITZ, A.; BALCH, C. M.; HALLER, D. G.; MORROW, M. BREAST. IN: GREENE, F. L.; PAGE, D. L.; FLEMING, I. D.; FRITZ, A.; BALCH, C. M.; HALLER, D. G.; MORROW, M. **AJCC Cancer Staging Manual**, 6. ed. New York: Springer, 2002. p. 223–240.

GUENTHER, J. M.; HANSEN, N. M.; DIFRONZO, L. A.; ET AL. Axillary dissection is not required for all patients with breast cancer and positive sentinel node. **Archives of Surgery**. v. 138, n. 1, p. 52–56, 2003.

GUNDIM, L. F.; DE ARAÚJO, C. P.; BLANCA, W. T.; GUIMARÃES, E. C.; MEDEIROS, A. A. Clinical staging in bitches with mammary tumors: Influence of type and histological grade. **The Canadian Journal of Veterinary Research**. v. 80, n. 4, p. 318–322, 2016.

HANSEN, N. M.; GRUBE, B.; YE, X.; YE, X.; TURNER, R. R.; BRENNER, R. J.; SIM, M.; GIULIANO, A.E. Impact of micrometastasis in the sentinel node of patients with invasive breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**. v. 27, n. 28, p. 4679–4684, 2009.

HÖINGHAUS, R.; VON WASIELEWSKI, R.; HEWICKER-TRAUTWEINY, M.; FREUNDZ, M.; MISCHKE, R. Immunocytological Detection of Lymph Node Metastases in Dogs with Malignant Epithelial Tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 137, n. 1, p. 1-8, 2007.

KURZMAN, I. D.; GILBERTSON, S. R. Prognostic factors in canine mammary tumors. **Seminars in veterinary medicine and surgery (small animal)**. v. 1, n. 1, p. 25–32, 1986.

MAASKANT-BRAAT, A. J.; VAN DE POLL-FRANSE, L. V.; VOOGD, A. C, COEBERGH, J. W.; ROUMEN, R. M.; NOLTHENIUS-PUYLAERT, M. C, NIEUWENHUIZEN, G. A. Sentinel node micrometastases in breast cancer do not affect prognosis: a population- based study. **Breast Cancer Research Treatment**. v. 127, n. 1, p. 195–203, 2011.

MACEWEN, E. G.; WITHROW, S. Tumors of the mammary gland. **Small Animal Oncology**. 3. ed. Philadelphia: Saunders Company, 1996, p. 356–372.

MACPHAIL, C. M. Cirurgia dos sistemas reprodutivos e genital. In: FOSSUM, T. W. **Cirurgia de Pequenos Animais**, 4. ed. Elsevier Brasil, 2015. Cap. 27, p. 809-814.

MATOS, A. J. F.; BAPTISTA, C. S.; GÄRTNER, M. F.; RUTTEMAN, G. R. Prognostic studies of canine and feline mammary tumours: The need for standardized procedures. **The Veterinary Journal**. v. 193, n. 1, p. 24-31, 2012.

MATOS, A. J. F.; FAUSTYNO, A.; LOPES, C.; RUTTEMAN, G.; GARTNER, F. Detection of lymph node micrometastases in malignant mammary tumours in dogs by cytokeratin immunostaining. **The Veterinary Record**, v. 158, n. 18, p. 626–630, 2006.

MILLIS, R. R.; SPRINGALL, R.; LEE, A. H.; RYDER, K.; RYTINA, E. R.; FENTIMAN, I. S. Occult axillary lymph node metastases are of no prognostic significance in breast cancer. **British Journal of Cancer - Nature**. v. 86, n. 3, p. 396–401., 2002.

MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in Domestic Animals**. 4. ed. Ames: Iowa State Press, 2002, 791p.

MISDORP, W.; ELSE, R. W., HELLMEN, E. **Histologic Classification of Mammary Tumors of the Dog and Cat**. v. 7. Washington, DC: Armed Force Institute of Pathology and World Health Organization, 1999, 59 p.

MISDORP, W.; HART, A. A. Prognostic factors in canine mammary cancer. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 56, n. 4, p. 779-786, 1976.

NOWIKIEWICZ, T.; ŚRUTEK, E.; ZEGARSKI, W. Application of immunohistochemistry for detection of metastases in sentinel lymph nodes of non-advanced breast cancer patients. **Polish Journal of Pathology**. v. 66, n. 1, p. 22-29 2015.

ORUCEVIC, A.; CHEN, J.; MCLOUGHLIN, J. M.; HEIDEL, R. E.; PANELLA, T.; BELL, J. Is the TNM staging system for breast cancer still relevant in the era of biomarkers and emerging personalized medicine for breast cancer — An institution's 10-year experience. **The Breast Journal**. v. 2, n. 2, p. 147–154, 2015.

OWEN, L. N. **TNM Classification of tumors in domestic animals**. Geneva: World Health Organization, 1980, 53 p.

PARK, D.; KÅRESEN, R.; NAUME, B.; SYNNESTVEDT, M.; BERAKI, E.; SAUER, T. The prognostic impact of occult nodal metastasis in early breast carcinoma. **Breast Cancer Research and Treatment**. v. 118, n. 57, p. 57–66, 2009.

PARODI, A. L.; MISDORP, W.; MIALOT, J. P.; MIALOT, M.; HART, A. A.; HURTREL, M.; SALOMON, J. C. Intratumoral BCG and Corynebacterium parvum therapy of canine mammary tumours before radical mastectomy. **Cancer Immunology, Immunotherapy**. v. 15, n. 3, p. 172-177, 1983.

PATSIKAS, M. N. DESSIRIS, A. The lymph drainage of the mammary glands in the bitch: a lymphographic study. Part I: The 1st, 2nd, 4th and 5th mammary glands. **Anatomy, Histology and Embryology**. v. 25, n. 2, p. 131–138, 1996a.

PATSIKAS, M. N.; DESSIRIS, A. The lymph drainage of the mammary glands in the bitch: a lymphographic study, part II: the 3rd mammary gland. **Anatomy, Histology and Embryology**. v. 25, n. 2, p. 139–143, 1996b.

PATSIKAS, M. N.; KARAYANNOPOULOU, M.; KALDRYMIDOY, E.; PAPAZOGLOU, L. G.; PAPADOPPOULOU, P. L.; TZEGAS, S. I.; TZIRIS, N. E.; KAITZIS, D. G, DIMITRIADIS, A. S, DESSIRIS, A. K. The lymph drainage of the neoplastic mammary glands in the bitch: a lymphographic study. **Anatomy, Histology and Embryology**. v. 35, n. 4, p. 228–234, 2006.

PAYNE, S. J.; BOWEN, R. L.; JONES, J. L, WEELS, C. A. Predictive markers in breast cancer—the present. **Histopathology**. v. 52, n. 1, p. 82–90, 2008.

PENÃ, L.; DE ANDRE, P. J.; CLEMENTE, M.; CUESTA. P.; PÉREZ-ALENZA, M. D. Prognostic Value of Histological Grading in Noninflammatory Canine Mammary Carcinomas in a Prospective Study With Two-Year Follow-Up: Relationship With Clinical and Histological Characteristics. **Veterinary Pathology**. v. 50, n. 1, p. 94-105, 2012.

PEÑA, L.; GAMA, A.; GOLDSCHMIDT, M. H.; ABADIE, J.; BENAZZI, C.; CASTAGNARO, M.; DÍEZ, L.; GÄRTNER, F.; HELLMÉN, E.; KIUPEL, M.; MILLÁN, Y.; MILLER, M. A.; POLI, A.; SARLI, G.; ZAPPULLI, V.; DE LAS MULAS, J. M. Canine mammary tumors: a review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**. v. 51, n. 1, p. 127–145, 2014.

PEREIRA, C. T.; MARQUES, L. N. F.; WILLIAMS, J.; DE MARTIN, W. B.; BOMBONATO, P. P. 99mTc-labeled dextran for mammary lymphoscintigraphy in dogs. **Veterinary Radiology & Ultrasound**. v. 495, n. 5, p. 487–491, 2008.

PEREIRA, C. T.; RAHAL, S. C.; BALIEIRO, J. C. C.; RIBEIRO, A. A. Lymphatic drainage on healthy and neoplastic mammary glands in female dogs: can it really be altered? **Anatomy, Histology and Embryology.** v.32, n. 5, p. 282–290, 2003.

PÉREZ-CALLEJO, D. P.; FRANCO, F.; NÚÑEZ, B.; GONZÁLES-LOIS, C.; CANTOS, B.; PROVENCIO, M. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer: the role of micrometastasis. **Medical Oncology.** v. 32, n. 2, p. 450-454, 2015.

PUGLIESE, M.; STEMPPEL, M.; PATIL, S.; HSU, M.; HO, A.; TRAINA, T.; MORROW M.; CODY, H.; GEMIGNANI, M. L. The clinical impact and outcomes of immunohistochemistry-only metastasis in breast cancer. **The American Journal of Surgery.** v. 200, n. 3, p. 368-373, 2010.

RABBAN, J. **The New Edition (7th) AJCC Staging System for Breast Cancer A Summary of Key Changes.** 2010. http://labmed.ucsf.edu/uploads/210/101_new_ajcc_staging_of_breast_cancer_what_has_changed.pdf Acesso em: 03 mar. 2016.

RAMOS-VARA, J. A.; BORST, L. B. Immunohistochemistry: Fundamentals and Applications in Oncology In: MEUTEN, D. J. **Tumors in Domestic Animals.** 5. ed. Wiley Blackwell, 2017. Cap. 3. p. 44-87..

RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V.; CASTAGNARO, M.; GOLDSCHMIDT, M. H. A retrospective study of those histopathologic parameters predictive of invasion of the lymphatic system by canine mammary carcinomas. **Veterinary Pathology,** v. 49, n. 2, p. 330–340, 2012.

REED, W.; BOHLER, P. J.; SANDSTAD, B.; NESLAND, J. M. Occult metastases in axillary lymph nodes as a predictor of survival in node-negative breast carcinoma with long-term follow-up. **The Breast Journal.** v. 10, n. 3, p. 174–180, 2004.

REHM, S.; STANISLAUS, D. J.; WILLIAMS, A. M. Estrous cycle-dependent histology and review of sex steroid receptor expression in dog reproductive tissues and mammary gland and associated hormone levels. **Birth Defects Research Part B Developmental and Reproductive Toxicology**. v. 80, n. 3, p. 233–245, 2007.

SANTOS, A. A.; LOPES, C. C.; RIBEIRO, J. R.; MARTINS, L. R.; SANTOS, J. C.; AMORIM, I. F.; GÄRTNER, F.; MATOS, A. J. Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: A multivariable survival study. **BMC Veterinary Research**. v. 9, n. 1, 2013.

SANTOS, M.; MARCOS, R.; FAUSTINO, A. M. Histological study of canine mammary gland during the oestrous cycle. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 45, n. 5, p. 146-154, 2010.

SHAO, M. M.; CHAN, S. K.; YU, A. M.; LAM, C. C.; TSANG, J. Y.; LUI, P. C.; LAW, B. K.; TAN, P. H.; TSE, G. M. Keratin expression in breast cancers. **Virchows Archiv**. v. 461, n. 3, p. 313-322, 2012

SHIMAZU, K.; NOGUCHI, S. Clinical significance of breast cancer micrometastasis in sentinel lymph node. **Surgery Today**. v. 46, n. 2, p. 155-160, 2016.

SILVER, I. A. The anatomy of the mammary gland of the dog and cat. **Journal of Small Animal Practice**. v. 7, n. 11, p. 689–296, 1966.

SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v. 33, n. 3, p. 573–596, 2003.

SORENMO, K. U.; DEANNA, R. W.; GOLDSMIDT, R. H. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Withrow and MacEwens Small Animal Clinical Oncology**. 5. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2013, p. 553-571.

SORENMO, K. U.; KRISTIANSEN, V. M.; COFONE, M. A.; SHOFER, F. S.; BREEN, A. M.; LANGELAND, M.; MONGIL, C. M.; GRONDAHL, A. M.; TEIGE, J.;

GOLDSCHMIDT, M. H. Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. **Veterinary and Comparative Oncology**. v. 7, n. 3, p. 162–172, 2009.

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

STROMBERG, P. C.; MEUTEN, D. J. Trimming Tumors for Diagnosis and Prognosis. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in Domestic Animals**. 5. ed. Wiley Blackwell, 2017. Cap. 2, p. 27-43.

SZCZUBIAL, M.; LOPUSZYNSKI, W. Prognostic value of regional lymph node status in canine mammary carcinomas. **Veterinary Comparative Oncology**, v. 9, n. 4, p. 296–303, 2011.

TAMAKI, Y.; AKIYAMA, F.; IWASE, T.; KANEKO, T.; TSUDA, H.; SATO, K.; UEDA, S.; MANO, M.; MASUDA, N.; TAKEDA, M.; TSUJIMOTO, M.; YOSHIDOME, K.; INAJI, H.; NAKAJIMA, H.; KOMOIKE, Y.; KATAOKA, T. R.; NAKAMURA, S.; SUZUKI, K.; TSUGAWA, K.; WAKASA, K.; OKINO, T.; KATO, Y.; NOGUCHI, S.; MATSUURA, N. Molecular detection of lymph node metastases in breast cancer patients: results of a multicenter trial using the one-step nucleic acid amplification assay. **Clinical Cancer Research**. v. 15, n. 8, p. 2879–84, 2009.

TSE, J. C.; KALLURI, R. Mechanisms of metastasis: epithelial-to-mesenchymal transition and contribution of tumor microenvironment. **J Cell Biochem**. v. 101, n. 4, p. 816-829, 2007.

TSUJIMOTO, M.; NAKABAYASHI, K.; YOSHIDOME, K.; KANEKO, T.; IWASE, T.; AKIYAMA, F.; KATO, Y.; TSUDA, H.; UEDA, S.; SATO, K.; TAMAKI, Y.; NOGUCHI, S.; KATAOKA, T. R.; NAKAJIMA, H.; KOMOIKE, Y.; INAJI, H.; TSUGAWA, K.; SUZUKI, K.; NAKAMURA, S.; DAITOH, M.; OTOMO, Y.; MATSUURA, N. One-step

nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. **Clinical Cancer Research.** v. 13, n. 16, p. 4807–16, 2007.

WANG, Y. S.; OU-YANG, T.; WU, J.; LIU, Y. H.; CAO, X. C.; SUN, X.; FU, L.; LIAO, N.; YANG, W.; ZHONG, W.; LU, L. Comparative study of one-step nucleic acid amplification assay, frozen section, and touch imprint cytology for intraoperative assessment of breast sentinel lymph node in Chinese patients. **Cancer Science.** v. 103, n. 11, p. 1989–93, 2012.

WEAVER, D. L.; ASHIKAGA, T.; KRAG, D. N.; SKELLY, J. M.; ANDERSON, S. J.; HARLOW, S. P.; JULIAN, T. B.; MAMOUNAS, E. P.; WOLMARK, N. Effect of Occult Metastases on Survival in Node-Negative Breast Cancer. **The New England Journal of Medicine.** v. 364, p. 412-21, 2011.

WELLS. A.; YATES, C.; SHEPARD, C. R. E-cadherin as an indicator of mesenchymal to epithelial reverting transitions during the metastatic seeding of disseminated carcinomas. **Clinical and Experimental Metastasis.** v. 25, n. 6, p. 621-628, 2008.

WITHROW, S. J. Why worry about cancer in pets? In: **Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology**, 4. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007, p. 9.

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

YEGIYANTS, S.; ROMERO, L. M.; HAIGH, P. I.; DIFRONZO, L. A. Completion axillary lymph node dissection is not required for regional control in patients with breast cancer who have micrometastases in a sentinel lymph node. **Archives of surgery.** v. 145, n. 6, p. 564–569, 2010.

ZENG, J.; ALEXANDER, M. A.; NIMEH, D.; DARVISHIAN, F. A. Note of Caution: Variable Cytokeratin Staining in Sentinel Node Metastases. **International Journal of Surgical Pathology.** v. 23, n. 7, p. 549– 552, 2015.

ZHANG, Y.; WANG, C.; XU, Y.; ZHU, Q.; ZHOU, Y.; ZHANG, J.; MAO, F.; JIANG, Y.; SUN, Q. Sensitivity, specificity and accuracy of ultrasound in diagnosis of breast cancer metastasis to the axillary lymph nodes in chinese patients. **Ultrasound in Medicine & Biology**. v. 41, n. 7, p. 1835–1841, 2015.

ZHI, X.; ZHANG, M.; MENG, T.; ZHANG, X.; SHI, Z.; LIU, Y.; LIU, J.; ZHANG, S.; ZHANG, J. Efficacy and feasibility of the immunomagnetic separation based diagnosis for detecting sentinel lymph node metastasis from breast cancer. **International Journal of Nanomedicine**. v. 10, p. 2775–2784, 2015.

CAPÍTULO 2

CÉLULAS TUMORAIS ISOLADAS OCULTAS EM LINFONODOS REGIONAIS DE CADELAS PORTADORAS DE CARCINOMAS MAMÁRIOS E SEU SIGNIFICADO PROGNÓSTICO

A. F. Coleto*, T. M. Wilson, N. P. Soares*, M. B. Bandarra*, E. C. Guimarães[†] and A. A. Medeiros-Ronchi*

**Laboratory of Veterinary Pathology, Federal University of Uberlândia, Brazil*

[†]*Faculty of Mathematics, Federal University of Uberlandia*

A SER SUBMETIDO NA REVISTA: *Journal of Comparative Pathology*

Resumo

Os tumores mamários caninos (TMC) são o tipo de neoplasia mais comum em cadelas. Assim como em humanos, a presença de metástase em linfonodos regionais é um importante fator prognóstico em cadelas portadoras de carcinomas mamários, porém, o significado clínico de células tumorais isoladas (CTI) ocultas em linfonodos ainda é indefinido nesta espécie. A eficácia da técnica de imunohistoquímica (IHQ) na identificação de CTI e micrometástases ocultas em comparação a técnica convencional de hematoxilina eosina foi avaliada, além da relação entre tamanho tumoral, tipo histológico, grau histológico e presença de metástase. A sobrevida de cadelas portadoras de carcinomas mamários com CTI ocultas em linfonodo regional também foi avaliada. Fragmentos de carcinoma mamário e linfonodos regionais de 59 cadelas foram avaliados. Lâminas histológicas das amostras de carcinoma mamário e linfonodos foram avaliadas para diagnóstico dos tumores e pesquisa de depósitos tumorais e submetidas ao teste de IHQ com o uso do anticorpo pan-citoqueratina AE1/AE3. Foram detectadas 35,2% de CTI ocultas e 2,8% de micrometástases ocultas pela técnica de IHQ.

Houve correlação entre o tamanho do tumor e a presença de metástase para o linfonodo ($p=0.77$). As CTI foram mais frequentemente observadas na região medular (60,7%) e as metástases na região cortical (44,4%). Não houve diferença estatística para sobrevida global pela curva de Kaplan-Meier (Log Rank ($p=0,466$), Breslow ($p=0,171$) e Tarone-Ware ($p=0,253$) entre cadelas com CTI ocultas e cadelas com linfonodos livres. A IHQ é capaz de detectar células tumorais ocultas em linfonodos previamente negativos pelo exame histopatológico. Cadelas portadoras de carcinomas mamários com CTI em linfonodo não apresentam menor sobrevida.

Palavras-chave: canino; tumor mamário; imunohistoquímica; metástases; sobrevida

Introdução

As neoplasias mamárias são frequentemente diagnosticadas em cadelas (Goldschmidt et al., 2017). A frequência dos tumores malignos é alta (aproximadamente 50%) (CARVALHO et al. 2016) e, no Brasil, cerca de 90% dos tumores mamários são malignos (Gamba et al., 2017). Estas características tumorais por si só justificam estudos prognósticos.

Vários fatores têm sido utilizados na determinação do prognóstico de cadelas com tumores mamários, entre eles tamanho tumoral (Sorenmo et al., 2009), tipo histológico (De Araújo et al., 2015), graduação histológica (Gundim et al., 2016) e sistema TNM (Owen, 1980) que considera a presença de células tumorais em linfonodos regionais um dos parâmetros para o estadio clínico de cadelas portadoras de tumores mamários caninos (TMC).

The American Joint Committee on Cancer (AJCC) categoriza a presença de células tumorais em linfonodos de mulheres com câncer de mama em: células tumorais isoladas (CTI) quando há aglomerados de células neoplásicas menores que 0,2 mm; micrometástases (MIC) aglomerados entre 0,2 e 2,0 mm e macrometástases (MAC) aglomerados maiores que 2,0 mm

(Greene *et al.*, 2002). Entretanto, o significado clínico das CTI e das micrometástases ocultas é divergente na Medicina Humana (Ahmed *et al.*, 2014).

Em cadelas, a presença de metástase em linfonodo tem impacto negativo na sobrevida (Szczubial and Lopuszynski, 2011; De Araújo *et al.*, 2015; Goldschmidt *et al.*, 2017), mas o significado clínico de CTI ocultas no linfonodo ainda é desconhecida na literatura veterinária (Matos *et al.*, 2006).

Rotineiramente a avaliação de metástases em linfonodos é realizada por meio de histopatologia convencional, porém com baixa sensibilidade em identificar CTI e micrometástases. Assim, a Imunohistoquímica (IHQ) tem demonstrado ser uma técnica de alta sensibilidade na detecção de CTI e micrometástases ocultas em linfonodos previamente negativos na avaliação em lâminas coradas em hematoxilina e eosina (HE) (Matos *et al.*, 2006; Beserra *et al.*, 2016).

No presente estudo, nós examinamos a eficácia da técnica de IHQ na identificação de CTI e micrometástases ocultas em comparação a técnica convencional de HE e nós avaliamos a sobrevida de cadelas portadoras de carcinomas mamários com CTI ocultas em linfonodo regional. Nos também avaliamos a relação entre tamanho tumoral, tipo histológico, grau histológico e presença de metástase, além de descrever a localização microanatômica das células neoplásicas em linfonodos.

Materiais e Métodos

Animais

Foram selecionadas 59 cadelas, de variadas raças e idades, castradas ou não, que foram encaminhadas voluntariamente para atendimento clínico-cirúrgico no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), no período de abril a julho de 2016.

As cadelas foram avaliadas clinicamente e todas possuíam exame radiográfico de tórax para pesquisa de metástase pulmonar. Foram excluídas do estudo cadelas com histórico de uso de tratamento adjuvante. Após avaliação clínica e conforme recomendação médica veterinária, as cadelas foram submetidas a tratamento cirúrgico pelas técnicas de mastectomia unilateral ou bilateral total, com retirada dos linfonodos regionais.

Para avaliação dos linfonodos utilizou-se como critérios de inclusão de cadelas no estudo: ser portadoras de carcinomas mamários que tivessem seus respectivos linfonodos drenantes excisados durante o procedimento cirúrgico, de acordo com Macphail (2015). Quando a cadela possuía somente um nódulo neoplásico maligno este deveria estar acompanhado do linfonodo drenante. Quando a cadela possuía mais de um nódulo neoplásico maligno, com tipos histológicos diferentes, considerou-se o tipo histológico mais agressivo, de acordo com Misdorp *et al.* (1999) e o nódulo deveria estar acompanhado do linfonodo drenante.

Utilizou-se o sistema TNM modificado por Sorenmo *et al.* (2013) para o estadio clínico das cadelas. Após a IHQ, quando necessário, as cadelas foram reestadiadas.

Amostras de tumor

Imediatamente após a excisão cirúrgica, a cadeia mamária foi enviada ao Laboratório de Patologia da UFU e submetida à palpação para identificação de nódulos palpáveis, que foram mensurados com auxílio de paquímetro (Zaas®) e classificados de acordo com o tamanho em T1 (< 3 cm), T2 (de 3 a 5 cm) e T3 (> 5 cm). Em seguida foram coletadas amostras de todas as mamas (afetadas ou não por nódulos ou massas palpáveis) e linfonodos. Cada amostra foi identificada com a denominação anatômica (mamas torácicas - M1 e M2, abdominais - M3 e M4 e inguinais - M5) e armazenada separadamente em frasco com solução de formol 10% tamponado.

O processamento das amostras para confecção das lâminas foi realizado segundo Tolosa *et al.* (2003) e secções histológicas de 4 μ m foram coradas pela técnica de HE. O diagnóstico foi realizado em estudo duplo cego por dois patologistas segundo Misdorp *et al.* (1999). O grau histológico foi atribuído de acordo com o sistema Nottingham modificado por Elston and Ellis (1991).

Imunohistoquímica

Foram avaliados em média três (mínimo de um e máximo de 12) cortes por linfonodo, sendo o número de cortes de linfonodo dependente do tamanho do mesmo. No caso de linfonodos pequenos, estes foram avaliados em único corte longitudinal no sentido do maior diâmetro, suficiente para capturar a maior área de superfície (Stromberg and Meuten, 2017).

Fragmentos de linfonodo incluídos em parafina foram seccionados e cortes de 4 μ m utilizados para pesquisa de células tumorais em linfonodos pela técnica de IHQ, utilizando o método de Hsu *et al.* (1981) modificado. As lâminas foram desparafinadas e a recuperação antigênica foi realizada em panela de pressão, utilizando tampão citrato (pH 6,0). A seguir realizou-se bloqueio da peroxidase endógena e incubação com anticorpo primário monoclonal anti-pan-

citoqueratina AE1/AE3 (Dako[®], M1535) conforme Matos *et al.* (2006), produzido em camundongo, diluído 1:400 em soroalbumina bovina (BSA 1%). As lâminas foram incubadas em câmara escura, overnight, a 4°C. Como sistema de revelação utilizou-se anticorpo secundário biotinilado e streptavidina peroxidase (kit LSAB - Dako[®]). As lâminas foram cuidadosamente lavadas com solução de TRIS HCl entre cada etapa. A reação foi revelada com cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB - Dako[®]) e as lâminas contra coradas com hematoxilina, desidratadas e montadas.

Utilizou-se como controle positivo glândula mamária normal e linfonodos com macrometástase. Como controle negativo, substitui-se o anticorpo primário pelo diluente do anticorpo (BSA 1%). Considerou-se imunomarcação para citoqueratina padrão de coloração intracitoplasmática (Ramos-Vara and Borst, 2017). Na presença de mais de um foco, foi considerado para a classificação das células tumorais o foco que possuía maior diâmetro em milímetros.

As lâminas foram avaliadas em estudo duplo cego. As imagens foram capturadas com câmera Moticam 580 acoplada a microscópio Eclipse Ci-L (Nikon[®]) e os aglomerados tumorais mensurados em milímetros (mm) através do Software Motic Images Plus 2.0 (Motic[®]).

Análise Estatística

Foram calculados os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia por meio de tabela de contingência 2x2, onde o teste de referência (padrão-ouro) foi a IHQ e o teste investigado para comparação foi o HE.

Teste de coeficiente de correlação de postos de Spearman através do Software Statistics Base para Windows V.20 (IBM[®] SPSS[®]) foi empregado para verificar a associação do tamanho do tumor com presença de metástase. Quando valor de *p* era de 0,01 a 0,19 a correlação foi

considerada muito baixa, entre 0,20 a 0,39 foi considerada baixa, entre 0,40 a 0,59 moderada, entre 0,60 a 0,79 boa correlação e entre 0,80 a 1,00 muito boa (Callegari-Jacques, 2003).

Sobrevida

Após a cirurgia de excisão dos tumores, foi feito o acompanhamento de 16 animais com CTI ocultas para o linfonodo com período médio de 18,5 meses (mínimo, 6 meses; máximo, 32 months). A sobrevida global (SG) foi definida como o período entre a cirurgia e a morte natural pelo tumor ou eutanásia em estágios avançados da doença. Nenhum dos animais recebeu qualquer quimioterapia adjuvante ou outro tratamento antitumoral após a cirurgia. Os animais que estavam vivos foram censurados.

As cadelas foram agrupadas em: animais com CTI ocultas e animais com linfonodos livres.

O Método de Kaplan-Meier foi utilizado no cálculo da curva de sobrevida, por meio do Software Statistics Base para Windows, V.20 (IBM® SPSS®). As curvas foram comparadas usando os testes de Log Rank (Mantel-Cox), Breslow (Generalized Wilcoxon) e Tarone-Ware. O nível de significância mínima foi estabelecido em $p<0,05$.

Resultados

A idade média das cadelas foi de 10,3 anos (4 a 17 anos). As cadelas mestiças representaram 50,8% (30/59) dos casos, as cadelas com raça definida 47,4% (28/59) e um caso não foi informado.

Das 59 cadelas, 55,9% (33/59) tinham um nódulo, 27,1% (16/59) tinham dois nódulos, 11,8% (7/59) tinham três nódulos, 3,3% (4/59) tinham quatro nódulos e apenas uma (1,6%) tinham sete nódulos, totalizando 101 amostras de tumor de mama. Destas, selecionou-se 62 amostras que atenderam aos critérios de inclusão. Cinquenta e seis cadelas haviam sido submetidas a

mastectomia unilateral total, e destas utilizou-se um nódulo mamário tumoral com o seu respectivo linfonodo drenante. Três cadelas passaram por mastectomia bilateral total sendo coletadas duas amostras de cada cedula e respectivos linfonodos drenantes, uma de cada antímero de acordo com os critérios anteriormente descritos.

As mamas inguinais (M5) foram mais acometidas correspondendo a 37,1% (23/62) dos casos, seguidas das abdominais caudais (M4) em 35,4% (22/62) (Tabela 1). Diagnosticou-se neste estudo 53,2% de carcinomas complexos (33/62) e 46,7% (29/62) de carcinomas simples (Tabela 1).

Tabela 1

Localização na cadeia mamária, classificação e grau histológico de 62 carcinomas mamários de cadelas

| | | <i>Número de casos</i> | <i>Direita (%)</i> | <i>Esquerda (%)</i> | <i>Si*</i> |
|--------------------------------|-------------------------|------------------------|--------------------|---------------------|------------------|
| <i>Gândula mamária</i> | Torácica cranial | 2 | 0 (0,0)** | 1 (50,0) | 1 (50,0) |
| | Torácica caudal | 4 | 1 (25,0) | 2 (50,0) | 1 (25,0) |
| | Abdominal cranial | 11 | 2 (18,1) | 7 (63,6) | 2 (18,1) |
| | Abdominal caudal | 22 | 8 (36,3) | 12 (54,5) | 2 (9,0) |
| | Inguinal | 23 | 11 (47,8) | 9 (39,1) | 3 (13,0) |
| <i>Grau</i> | | | <i>I (n=32)</i> | <i>II (n=28)</i> | <i>III (n=2)</i> |
| <i>Diagnóstico histológico</i> | Carcinoma complexo | 33 | 19 (57,5) | 13 (39,3) | 1 (3,0) |
| | Carcinoma tubulopapilar | 22 | 11 (50,0) | 11 (50,0) | 0 (0,0) |
| | Carcinoma sólido | 7 | 2 (28,5) | 4 (57,1) | 1 (14,2) |

*Sem informação.

Um linfonodo axilar ipsilateral foi removido de 10,1% (6/59) das cadelas, um linfonodo inguinal ipsilateral foi removido de 64,4% (38/59) e múltiplos linfonodos inguinais ipsilaterais foram removidos de 25,4% (15/59) das cadelas.

Coletou-se 78 linfonodos regionais das 62 amostras de carcinomas mamários e na avaliação histopatológica 91,0% (71/78) dos linfonodos estavam livres de células tumorais, em 2,5% (2/78) foram observadas CTI e em 6,4% (5/78) metástases (macro e micrometástases).

Na avaliação imunohistoquímica, 56,4% (44/78) dos linfonodos foram diagnosticados como livres de células tumorais, 34,6% (27/78) com CTI (Figura 1) e 8,9% (7/78) com metástases (Tabela 2).

Tabela 2

Frequência de células tumorais isoladas e metástases em linfonodos de cadelas portadoras de carcinomas mamários, detectadas pela técnica de imunohistoquímica, de acordo com o tipo, grau histológico e localização microanatômica.

| | | <i>Número de casos</i> | <i>Ausência de metástases (n=44)</i> | <i>Macrometástases (n=3)</i> | <i>Micrometástases (n=4)</i> | <i>Células Tumorais Isoladas (n=27)</i> |
|-----------------------------------|-------------------------|------------------------|--------------------------------------|------------------------------|------------------------------|---|
| <i>Diagnóstico histológico</i> | Carcinoma complexo | 37 | 18 (48,6)* | 2 (5,4) | 2 (5,4) | 15 (40,5) |
| | Carcinoma tubulopapilar | 31 | 22 (70,9) | 0 (0,0) | 2 (6,4) | 7 (22,5) |
| | Carcinoma sólido | 10 | 4 (40,0) | 1 (10,0) | 0 (0,0) | 5 (50,0) |
| <i>Grau</i> | I | 36 | 24 (66,6) | 1 (2,7) | 1 (2,7) | 10 (27,7) |
| | II | 38 | 20 (52,6) | 2 (5,2) | 3 (7,8) | 13 (34,2) |
| | III | 4 | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 4 (100,0) |
| <i>Localização microanatômica</i> | Subcapsular | 3 | - | 1 (33,3) | 1 (33,3) | 1 (33,3) |
| | Cortical | 13 | - | 2 (15,3) | 2 (15,3) | 9 (69,2) |
| | Medular | 18 | - | 0 (0,0) | 1 (5,5) | 17 (94,4) |
| | Seios medulares | 3 | - | 1 (33,3) | 1 (33,3) | 1 (33,3) |

*Os números entre parênteses indicam porcentagens.

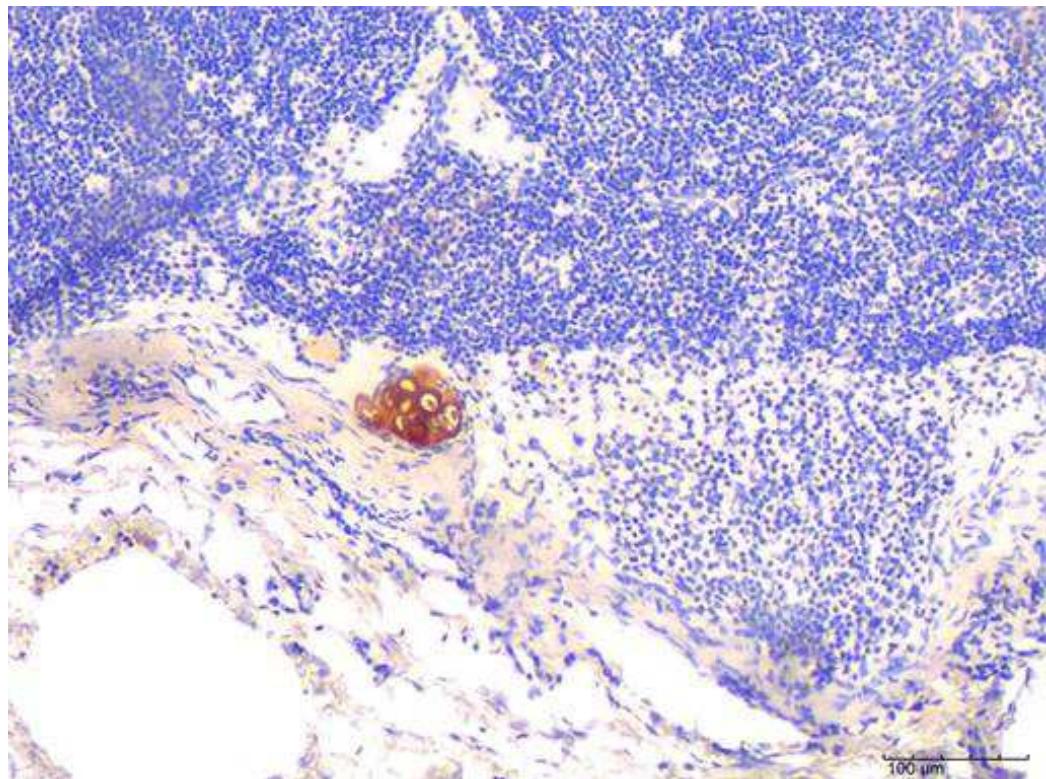


Fig. 1. Linfonodo inguinal de cedula portadora de carcinoma tubulopapilar grau I. Células tumorais isoladas localizadas na região subcapsular expressando AE1/AE3. IHQ. Bar, 100 μ m.

Cadelas com tumores maiores apresentaram metástases em linfonodos com maior frequência, apresentando boa correlação pelo teste de Spearman ($p=0.77$).

Carcinomas complexos apresentaram metástases (macro e micrometástases) (Tabela 2) em 0,8% (4/37) dos casos e carcinomas simples em 7,3% (3/41) dos casos. Tumores de grau I apresentaram metástase em 5,5% (2/36) dos casos e, considerando-se em conjunto tumores de graus II e III, 11,9% (5/42) apresentaram metástase.

A localização microanatômica predominante de CTI foi a região medular em 60,7% (17/28), seguida da região cortical em 32,1% (9/28), seio medular em 3,5% (1/28) e região subcapsular em 3,5% (1/28). A localização das metástases foi mais frequente na região cortical em 44,4% (4/9), seio medular em 22,2% (2/9), região subcapsular em 22,2% (2/9) e região medular em 11,1% (1/9) (Tabela 2). Em três linfonodos foram observadas células tumorais em duas regiões

distintas, sendo um linfonodo com macrometástase na região subcapsular e seios medulares; um com micrometástase na cortical e seios medulares e um com CTI na cortical e seios medulares.

Com a utilização da técnica de IHQ houve incremento de 35,2% na detecção de CTI ocultas quando comparado com o exame histopatológico. Também houve incremento de 2,8% na detecção de micrometástases ocultas.

Com relação à eficácia do teste histopatológico na detecção de células tumorais, observou-se sensibilidade de 20,0%, especificidade 100,0%, VPP 100,0%, VPN 61,0% e acurácia 65,0%.

Após a avaliação imunohistoquímica, 28,8% (17/59) das cadelas foram reestadiadas e passaram para o estadio IV.

Na análise de SG pela curva de Kaplan-Meier, as cadelas com CTI ocultas (n=16) apresentaram média de sobrevida de 725,7 dias (variando entre 510,8 a 940,7 e não alcançando a mediana de sobrevivência). As cadelas sem metástases (n=29) apresentaram média de sobrevida de 833,5 (variando entre 730,2 – 936,9 e mediana de 921 dias). Não houve diferença entre as curvas de sobrevida das cadelas com CTI ocultas e sem metástases (Log Rank p=0,466; Breslow p=0,171 e Tarone-Ware p=0,253) (Figura 2).

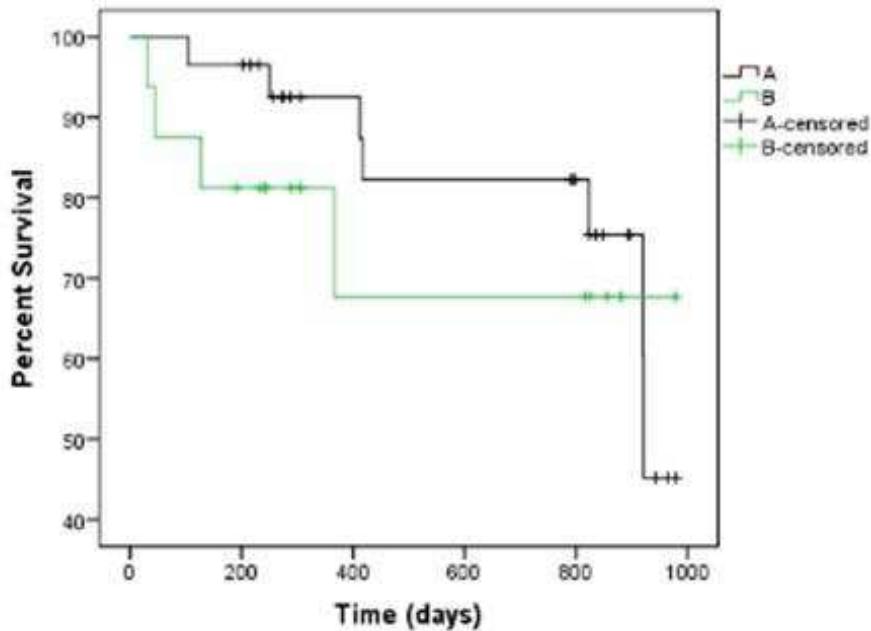


Fig. 2. Curva de sobrevida Kaplan-Meier de cadelas com carcinoma mamário sem metástases e com células tumorais isoladas (CTI) em linfonodos regionais: A (ausência de metástase; n = 29; mediana, 921 dias), B (células tumorais isoladas; n = 16). As cadelas com CTI não atingiram a mediana de sobrevivência.

Discussão

Carcinomas mamários foram mais frequentes em cadelas adultas e idosas ($X= 10,3$ anos), assim como relatado por Coelho (2014) ($X=9,7$ anos), De Araújo *et al.* (2015) ($X=10,7$ anos) e Beserra *et al.* (2016) ($X=10,3$ anos). As cadelas mestiças foram mais frequentemente acometidas, semelhante ao estudo de Matos *et al.* (2006) que descreveram 52,5% das cadelas sem raça definida e 47,5% como cães de raça.

As mamas inguinais e abdominais caudais ($M5+M4= 72,5\%$) foram mais acometidas. Matos *et al.* (2006) também diagnosticaram frequentemente lesões em $M4$ e $M5$ (67,7%), assim como De Araújo *et al.* (2015) (66,6%) e Beserra *et al.* (2016) (72,1%). Os TMC acometem preferencialmente as glândulas caudais e inguinais (Hedlund, 2005; Nogueira and Castro, 2017)

devido ao maior volume de parênquima mamário nesta região que pode sofrer alterações proliferativas causadas pelo estrogênio (O'Keffe, 1997; Queiroga and Lopes, 2002)

A maioria dos linfonodos retirados no procedimento cirúrgico era inguinal. De Araújo *et al.* (2015) também relataram pequeno número de linfonodo axilares retirados (5,7%), fato que está relacionado à menor frequência de neoplasias nas mamas torácicas, como observado neste estudo.

Tumores maiores apresentaram metástases com maior frequência. Este fato está relacionado ao aumento da agressividade da neoplasia conforme o aumento do tamanho tumoral e corrobora com estudos anteriores (Chang *et al.*, 2005; Oliveira Filho *et al.*, 2010).

Os carcinomas complexos foram os mais frequentemente diagnosticados (53,2%) e a alta frequência de metástase de carcinoma complexo observada neste estudo pode estar associada a presença de subtipos histológicos agressivos. Tumores de graus II e III apresentaram metástases com maior frequência, assim como relatado por Rasotto *et al.* (2012) e Coelho (2014), e esta característica está relacionada à maior agressividade observada em carcinomas de maior grau.

As CTI foram mais observadas na região medular do linfonodo e as metástases na região cortical. Até o momento, não há na literatura veterinária descrição da localização microanatômica de células neoplásicas dentro do linfonodo. Estudos clínicos em humanos demonstraram associação entre a localização e o envolvimento de linfonodo não-sentinela (Van Deurzen *et al.*, 2008).

Houve expressivo aumento na identificação de CTI pela técnica de IHQ, possivelmente associado à dificuldade na identificação de aglomerados tumorais isolados em lâminas histológicas convencionais (Beserra *et al.*, 2016). Houve ainda aumento na identificação de micrometástases, como relatado por Matos *et al.* (2006) (9,2%) e Coelho (2014) (6,8%).

O teste HE apresentou baixa sensibilidade na detecção de CTI e metástases. Assim como observado por Matos *et al.* (2006) e Peña *et al.* (2014), o presente estudo reforça a importância

da IHQ como ferramenta na detecção de pequenos aglomerados tumorais. Na patologia humana, a técnica de IHQ para linfonodos previamente negativos em HE ou em casos duvidosos já é bem estabelecida (Sorenmo *et al.*, 2011), porém em Medicina Veterinária a sua utilização ainda não é rotineira.

Dezesete cadelas foram reestadiadas e passaram para o estadio IV. O sistema TNM modificado para cães, que considera o status N como N0 (sem metástase) ou N1 (com metástase, inclusive CTI), é extremamente simples, podendo, por exemplo, superestimar o prognóstico do animal. Se identificadas CTI em uma cedula portadora de tumor menos agressivo, esta passa diretamente para o estadio IV (Matos *et al.*, 2006), assim como no presente estudo, onde quatro cadelas reestadiadas possuíam CTI advindas de carcinomas complexos grau I. Porém, muitas vezes a presença do CTI pode não resultar no estabelecimento de um novo foco metastático. O sistema TNM modificado para cães negligencia avaliações adicionais dos linfonodos, tais como o número de linfonodos afetados, que é considerado fator prognóstico em mulheres com câncer de mama (Fitzgibbons *et al.*, 2000; Goldhirsch *et al.*, 2009). Em cadelas, estudo recente relatou pior sobrevida em cadelas com dois ou mais linfonodos afetados (De Araújo *et al.*, 2015).

A presença de CTI no linfonodo não foi associada a pior prognóstico (menor sobrevida). De Araújo *et al.* (2015) observaram menor tempo de SG para cadelas com CTI identificadas em HE e confirmadas em IHQ. Os autores relataram que 33,3% dos animais com CTI foram diagnosticados com tumores agressivos, como carcinossarcoma e carcinoma sólido. Entretanto, em nosso estudo, 36,6% dos animais com CTI foram diagnosticados com tumores menos agressivos, como carcinoma complexo grau I e carcinoma simples grau I. Estudos tem demonstrado que o prognóstico das CTI pode estar relacionado ao tipo histológico em humanos (Cserni *et al.*, 2003; Imoto *et al.*, 2006; De Boer *et al.*, 2009; Ahmed *et al.*, 2014) e animais (De Araújo *et al.*, 2015).

O significado do tamanho dos depósitos tumorais em linfonodos é bem estabelecido em humanos (Cummings *et al.*, 2002; Reed *et al.*, 2004) e em cadelas relatou-se que metástases maiores que 7,32 mm resultou em menor sobrevida, porém o mesmo não ocorreu com micrometástases (De Araújo *et al.*, 2015). Em nosso estudo, a presença de CTI ocultas não afetou a sobrevida de cadelas portadoras de carcinomas mamários.

Os achados deste estudo podem beneficiar a busca por uma futura padronização de métodos de avaliação de linfonodos regionais. A limitação do estudo incluiu a ausência de informações fornecidas pelos proprietários de várias cadelas.

O presente estudo revelou a alta sensibilidade do teste de IHQ para a identificação de CTI e micrometástases ocultas em HE e recomenda-se o uso da técnica na rotina laboratorial. O tamanho do tumor influencia na ocorrência de metástase ($p=0,77$), reforçando a importância do diagnóstico e tratamento precoce de neoplasias mamárias. A presença de CTI ocultas no linfonodo não teve impacto na sobrevida de cadelas, demonstrando a necessidade de explorar melhor o desenvolvimento ou não de focos tumorais em linfonodos a partir da instalação de CTI.

Declaração de Conflitos de Interesse

Os autores não declaram potenciais conflitos de interesse com respeito à pesquisa, autoria, e/ou publicação deste artigo.

Financiamento

Os autores divulgam o recebimento de apoio financeiro para a realização deste artigo: O trabalho foi parcialmente apoiado por uma bolsa de mestrado financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia por disponibilizar o acesso aos pacientes e ao material de pesquisa. Professor Doutor Enio Ferreira pelo auxílio nas análises estatísticas.

Referências

- Ahmed SS, Thike AA, Iqbal J, Yong WS, Tan B *et al.* (2014). Sentinel lymph nodes with isolated tumour cells and micrometastases in breast cancer: clinical relevance and prognostic significance. *Journal of Clinical Pathology*, **67**, 243-250.
- Beserra HEO, Grandi F, Duflot RM, Pinheiro LGP, Miot HA *et al.* (2016). Metastasis of mammary carcinoma in bitches: evaluation of the sentinel lymph node technique. *Advances in Breast Cancer Research*, **5**, 58-65.
- Callegari-jacques SM (2003). *Bioestatística: princípios e aplicações*, Porto alegre, pp. 255.
- Chang S, Chang C, Chang T, Wong M (2005). Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **227**, 1625-1629.
- Coelho VS (2014) *Abordagem imuno-histoquímica otimiza a identificação de Micrometastases nodais em cães portadores de carcinomas mamários*. Dissertação Me, Universidade Paulista.
- De Araújo MR, Campos LC, Ferreira E, Cassali GD (2015). Quantitation of the regional lymph node metastatic burden and prognosis in malignant mammary tumors of dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **29**, 1360-1367.
- Elston CW, Ellis IO (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, **19**, 403-410.
- Gamba CO, Ferreira E, Salgado BS, Damasceno KA, Bertagnolli AC *et al.* (2017). *Patologia mamária canina, do diagnóstico ao tratamento*. São Paulo: Medvet.
- Greene FL, Page DL, Flemin ID *et al.* (2002) Breast. In: *AJCC Cancer Staging Manual*, 6th Edit., FL Greene, DL Page, ID Fleming, A Fritz, CM Balch, DG Haller, M Morrow, Eds., New York, pp. 223-240.
- Hedlund CS (2005) Cirurgia dos sistemas reprodutivos e genital. In: *Cirurgia de Pequenos Animais*, 2 Ed, TW Fossum, Ed., pp. 631-637.
- Hsu SM, Faine L, Fanger H (1981). A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and the avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *American Journal of Clinical Pathology*, **75**, 734-738.
- Macphail CM (2015) Cirurgia dos sistemas reprodutivos e genital. In: *Cirurgia de Pequenos Animais*, 4 Ed, TW Fossum, Ed., pp. 809-814.
- Matos AJF, Faustyno A, Lopes C, Rutteman G, Gartner F (2006). Detection of lymph node micrometastases in malignant mammary tumours in dogs by cytokeratin immunostaining. *The Veterinary Record*, **158**, 626-630.
- Misdorp W, Else RW, Hellmen E, Lipscomb TP (1999). *Histologic Classification of Mammary Tumors of the Dog and Cat*. v7. Washington.
- Misdorp W, Hart AA (1976). Prognostic factors in canine mammary cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, **56**, 779-786.
- Olkke DA (1997) Tumores do sistema genital e das glândulas mamárias. In: *Tratado de Medicina Interna Veterinária*, 4 Ed, SJ Ettinger, EC Feldman, Eds., pp. 2344-2351.
- Oliveira Filho JC, Kommers GD, Masuda EK, Marques BMFPP, Fighera RA *et al.* (2010). Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **30**, 177-185.
- Owen LN. *TNM Classification of Tumors in Domestic Animals* (1980). Geneva.
- Peña L, Gama A, Goldschmidt MH, Abadie J, Benazzi C *et al.* (2014) Canine mammary tumors: a review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial

- phenotype markers, her2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, **51**, 127–145.
- Queiroga F, Lopes C. Tumores Mamários Caninos: novas perspectivas. In: *Congresso de Ciências Veterinárias*. Oeiras, 2002. Anais...Oeiras, p.183-190, 2002.
- Ramos-Vara JA, Borst LB (2017) Immunohistochemistry: fundamentals and Applications in Oncology. In: *Tumors in domestic animals*, 5th Edit, DJ Meuten, Ed., pp. 44-87.
- Rasotto R, Zappulli V, Castagnaro M, Goldschmidt MH (2012). A retrospective study of those histopathologic parameters predictive of invasion of the lymphatic system by canine mammary carcinomas. *Veterinary Pathology*, **49**, 330–340.
- Sorenmo KU, Deanna RW, Goldsmidt RH (2013) Tumors of the Mammary Gland. In: *Withrow and Macewen's Small Animal Clinical Oncology*, 5th Edit, SJ Withrow, DM Vail, Eds., Philadelphia, pp. 553-571.
- Sorenmo KU, Kristiansen VM, Cofone MA, Shofer FS, Breen M *et al.* (2009). Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Veterinary Comparative Oncology*, **7**, 162–172.
- Sorenmo KU, Rasotto R, Zappulli V, Goldschmidt MH (2011). Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Veterinary Pathology*, **48**, 85-97.
- Stromberg PC, Meuten DJ (2017) Trimming tumors for diagnosis and prognosis. In: *Tumors in domestic animals*, 5th Edit, DJ Meuten, Ed., pp. 27-43.
- Szczubial M, Lopuszynski W (2011). Prognostic value of regional lymph node status in canine mammary carcinomas. *Veterinary Comparative Oncology*, **9**, 296–303.
- Tolosa EMC, Rodrigues CJ, Behmer AO, Freitas Neto AG (2003). *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*, 5 Ed, Barueri.
- Van Deurzen CHM, Seldenrijk CA, Koelemij R, Van Hillegersberg R, Hobbelink MGG, Van Diest PJ (2008). The microanatomic location of metastatic breast cancer in sentinel lymph nodes predicts nonsentinel lymph node involvement. *Annals of surgical oncology*, **15**, 1309-1315.

APÊNDICE

Apêndice A – Instruções aos autores para publicação no periódico “*Journal of Comparative Pathology*”

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review.](#)

Format of Articles

Articles must be concise and unnecessary duplication of data in text, tables and graphs should be avoided. Allusions to published work must be brief and limited to what is necessary to evaluate the findings in the manuscript. Extensive reviews of the literature will not be permitted, except in Review Articles.

To avoid repetition, if a related article by the same authors, or some of them, is being offered to a different journal, a copy of that article must be provided, in confidence, for comparison.

Before submitting manuscripts authors are recommended to consult recent issues of the Journal to see the form in which the articles appear.

Manuscripts should be word processed. Times New Roman font at 12 pitch should be used, with generous margins and full double spacing throughout. Each line should be numbered by using the line numbering facility within the word processing package.

Papers should normally comprise:

1. A Summary of the findings presented in the paper and the conclusions drawn from them. Authors may, if they wish, suggest not more than four Keywords that should follow the summary.
2. A brief Introduction stating the purpose of the paper.
3. A concise account of the Materials and Methods used. Authors should note that appropriate positive and negative controls should be performed for all experimental techniques and the nature of these controls should be described with the methodology.
4. A record of the Results. Systeme Internationale (S.I.) units should be used.
5. A Discussion of the significance of the results.
6. Any necessary Acknowledgments for assistance. All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgments section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance. Finally, the acknowledgments section should include a declaration concerning Funding and any Role of the Funding Source. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.
7. A Conflict of Interest statement. All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

Reference Style

References to published work cited in the text, in alphabetical order. The form should be:

Durand S, Murphy C, Zhang Z, Alexandersen S (2008) Epithelial distribution and replication of foot-and-mouth disease virus RNA in infected pigs. *Journal of Comparative Pathology*, **139**, 86-96.

Where a reference has more than five authors, please give the first five authors followed by et al.

Beuermann C, Beck J, Schmelz U, Dunkelberg H, Schütz E et al. (2009) Tissue calcium content in piglets with inguinal or scrotal hernias or cryptorchidism. *Journal of Comparative Pathology*, **140**, 182-186.

In the text, references to publications by three or more authors should be given in the style "Jones et al." on each occasion.

Titles of books must be given in full with publisher, place of publication and edition if other than first, e.g. Dellman HD (1998) Endocrine system. In: *Textbook of Veterinary Histology*, 5th Edit., HD Dellman, J Eurell, Eds., Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 287-302.

PhD theses should be cited as: Allenspach K (2002) *Chronic Enteropathies in Dogs - Research into the Pathogenesis, Diagnosis and Treatment*. PhD Thesis, University of Berne.

Graphical Abstracts

The Journal will publish a 'graphical abstract' in the on-line version of the Table of Contents for each issue of the Journal. Graphical abstracts comprise a single image (that may or may not be one of the figures in a paper) that encapsulates the subject of the paper. The image may be accompanied by a single sentence of text (of no more than 50 words) that describes the key message of the paper. Graphical abstracts will not be published in the print or on-line versions of the actual paper. Graphical abstracts are optional, but where authors would like to include such an abstract the image and proposed sentence must be submitted with a revised manuscript. The sentence may be modified by the Editor-in-Chief.

Tabulated Material

Tables require captions and should be self-explanatory. Each column should have a heading that accurately describes all entries beneath. Tables should be submitted on separate sheets and designed to fit into the type area of one printed page or less. Authors should consult a recent copy of the Journal and follow as closely as possible the format of tables therein.

Illustrative Material

All illustrative material must be of high quality. Text figures (i.e., diagrams, charts, graphs), should bear lettering, numbers and symbols large enough to be legible after sizing to the journal pages. The figures will be inserted in the text at appropriate places. Authors may wish to have several illustrations grouped into a composite plate. If so, they should submit a sketch plan of the suggested layout but not electronically group the photographs as this work will be undertaken by the Publisher. Such composite blocks should be of the same proportions as the page of the Journal. Where the author wishes to draw attention to particular features by means of arrows or lettering, these should be superimposed electronically on the photographs. **No charge will be made for a reasonable number of figures or for the use of colour for photographic illustrations if, in the Editor's opinion, it enhances the presentation of results.** The maximum page area available for blocks is 23 x 16.9 cm. Figures designed to span one or both columns on a page should be 8.2 cm or 16.9cm wide, respectively.

Legends to all illustrations submitted should be shown separately and, where appropriate, should state the stain and magnification. The latter should be given in the form of a magnification bar inserted directly onto the image.

The following formats can be used to submit figures electronically: EPS; TIFF (minimum resolution of 300 dpi for colour and halftones, 1000 dpi for bitmapped line drawings and 500 dpi for combination halftone/line drawing); DOC/XLS/PPT (if figures are created in any Microsoft Office application please supply "as is"). For a detailed guide on electronic artwork please visit our website <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Use of Copyright Material

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Oxford, UK: phone (+1) 215 239 3804 or +44(0)1865 843830, e-mail healthpermissions@elsevier.com. Requests may also be completed online via <http://www.elsevier.com/permissions>.

Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.

Essential Title Page Information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a superscript symbol immediately after the author's name and in front of the appropriate address. The hierarchy of symbols used by this Journal may be seen by consulting a recent issue. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, the current affiliation of that author may be indicated in the Acknowledgments section of the manuscript.

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

RESEARCH DATA

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

Virtual Microscope

The journal encourages authors to supplement in-article microscopic images with corresponding high resolution versions for use with the Virtual Microscope viewer. The Virtual Microscope is a web based viewer that enables users to view microscopic images at the highest level of detail and provides features such as zoom and pan. This feature for the first time gives authors the opportunity to share true high resolution microscopic images with their readers. [More Information and examples](#). Authors of this journal will receive an invitation e-mail to create microscope images for use with the Virtual Microscope when their manuscript is first reviewed. If you opt to use the feature, please contact virtualmicroscope@elsevier.com for instructions on how to prepare and upload the required high resolution images.

AFTER ACCEPTANCE***Use of the Digital Object Identifier***

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher on initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF