

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

DANIEL GIORDANI SILVEIRA

**METÁSTASE DE CARCINOMA MAMÁRIO EM LINFONODOS REGIONAIS DE
CADELAS E SEU SIGNIFICADO PROGNÓSTICO**

Projeto de pesquisa apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2.

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi
Coorientadora: MSc. Arlinda Flores Coletto

UBERLÂNDIA - MG

2019

DANIEL GIORDANI SILVEIRA

**METÁSTASE DE CARCINOMA MAMÁRIO EM LINFONODOS REGIONAIS DE
CADELAS E SEU SIGNIFICADO PROGNÓSTICO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do grau de Médico Veterinário.

Uberlândia, 16 de dezembro, de 2019

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi
Universidade Federal de Uberlândia

Prof. Dr. Fernando Antônio Ferreira
Universidade Federal de Uberlândia

MSc. Arlinda Flores Coletto
Universidade Federal de Uberlândia

AGRADECIMENTOS

Eis que enfim se aproximam os momentos conclusivos da minha trajetória no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia. Manifesto abaixo a minha gratidão a todos que participaram deste trabalho e da minha formação acadêmica e humana.

Agradeço:

Primeiramente a Deus, por sempre zelar por mim e por me guiar.

Aos meus pais, Manoel e Maria Vitória, e ao meu irmão, André, pelo apoio e incentivo, mesmo à distância. É o amor de vocês que me dá alicerce para continuar sempre crescendo.

Aos meus padrinhos, Maria Sulênia, José Augusto, Maria Helena e José Faria, por serem segundos pais para mim. Obrigado pelas orações e pelo carinho dispendido.

À toda minha família, pela torcida, em especial a minha prima Glauciane, pelo suporte em todos os momentos da minha vida. Você é uma irmã para mim.

À 82ª turma de Medicina Veterinária pelos anos de convivência e por tudo que passamos juntos. Não poderia ter me matriculado em uma turma melhor.

Ao Monkey, lugar onde morei por toda a graduação e a todos moradores que conviveram comigo nesse período. Obrigado pela amizade de vocês, pelos almoços em conjunto, por todas as nossas risadas, e sobretudo por me darem força quando os dias eram um pouco menos felizes. Vocês são especiais para mim.

À Atlética Agrárias por confiar em meu trabalho dentro da diretoria, por todos os eventos e jogos que participei.

À Bateria Invasora e aqui agradeço a seus ritmistas, obrigado por serem a minha válvula de escape, pelos momentos de descontração, por todos os ensaios, pelas nossas bossas criadas e acima de tudo por me aceitarem e me auxiliarem no cargo de presidente.

A todos os amigos que fiz no mundo das Baterias Universitárias, vocês são incríveis!

Aos membros do Laboratório de Patologia Animal, que me incentivaram e me fizeram amar ainda mais os estudos em Patologia.

À Professora Drª. Alessandra meu eterno agradecimento, primeiramente por ter me aceitado como seu orientado. Obrigado por todos os ensinamentos transmitidos, por acreditar nas minhas capacidades e por me fazer evoluir não somente no âmbito acadêmico, mas também, como ser humano.

Ao Professor Dr. Fernando Ferreira, por ter prontamente aceitado ser membro da minha banca.

À Arlinda pelo apoio e direcionamento em minha pesquisa, sua ajuda foi essencial para a conclusão deste trabalho.

Às cadelas que foram a fonte deste estudo, pois sem elas este trabalho não poderia ser feito.

À Cnpq e a ProPP-UFU, pela oportunidade concedida para a execução desta pesquisa.

RESUMO

Os tumores mamários caninos são o tipo de neoplasia mais comum em cadelas. Nas mulheres, a presença de metástases em linfonodos regionais é um importante fator prognóstico, e o mesmo se percebe em cadelas com carcinomas mamários. Todavia, o significado clínico do tipo de metástase presente nos linfonodos ainda é indefinido na espécie canina. Também não existem estudos avaliando a influência da localização das metástases no linfonodo sobre a sobrevida. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da técnica de Imunohistoquímica (IHQ) na pesquisa de células tumorais isoladas e micrometástases ocultas em comparação à técnica convencional de Hematoxilina-Eosina, em linfonodos de cadelas portadoras de carcinomas mamários; verificar a relação entre tamanho tumoral, tipo histológico, grau histológico e presença de células neoplásicas em linfonodo. Foi avaliada também a sobrevida de cadelas portadoras de carcinomas mamários com metástases em linfonodo regional. Fragmentos de carcinoma mamário e linfonodos regionais de cadelas foram avaliados para diagnóstico dos tumores e pesquisa de depósitos tumorais e submetidas ao teste de IHQ com o uso do anticorpo pan-citoqueratina AE1/AE3. Teste de coeficiente de correlação de postos de Spearman foi empregado para verificar a associação do tamanho do tumor, tipo histológico, grau histológico e presença de células neoplásicas em linfonodo. O Método de Kaplan-Meier foi utilizado no cálculo da curva de sobrevida. Cadelas que possuem metástase possuem sobrevida menor, e as que possuem metástases maiores possuem sobrevida menor que as que possuem metástases menores. Os focos metastáticos foram mais observados no seio subcapsular dos linfonodos. Houve baixa correlação entre tamanho do tumor e a presença de metástases.

Palavras-chave: Citoqueratina; Cão; Disseminação; Neoplasia Mamária; Sobrevida.

ABSTRACT

Canine mammary tumors are the most common type of neoplasia in bitches. In women, the presence of regional lymph node metastases is an important prognostic factor, and the same is seen in bitches with breast carcinomas. However, the clinical significance of the type of metastasis present in the lymph nodes is still undefined in the canine species. There are also no studies evaluating the influence of lymph node metastasis on survival. Thus, the objective of this study was to evaluate the efficacy of the Immunohistochemistry (IHC) technique in the investigation of isolated tumor cells and hidden micrometastases in comparison to the conventional Hematoxylin-Eosin technique in lymph nodes of bitches with mammary carcinomas; to verify the relation between tumor size, histological type, histological grade and the presence of neoplastic cells in lymph node. Survival of bitches bearing mammary carcinomas with regional lymph node metastases was also evaluated. Fragments of mammary carcinoma and regional lymph nodes of bitches were evaluated for the diagnosis of tumors and the search for tumor deposits and submitted to the IHC test with the use of pan-cytokeratin antibody AE1 / AE3. Spearman rank correlation coefficient test was used to verify the association of tumor size, histological type, histological grade and presence of neoplastic cells in the lymph node. The Kaplan-Meier method was used to calculate the survival curve. Bitches with metastasis have shorter survival, and those with higher metastases have shorter survival than those with lower metastases. Metastatic foci were most commonly seen in the subcapsular lymph node. There was a low correlation between tumor size and the presence of metastasis.

Keywords: Cytokeratin; Dissemination; Dog; Mammary Neoplasia; Survival.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	8
2	OBJETIVO	10
3	REVISÃO DE LITERATURA	11
3.1	Epidemiologia das Neoplasias Mamárias em Cadelas	11
3.2	Histologia das Neoplasias Mamárias	11
3.3	Grau Histológico	13
3.4	Sistema TNM	14
3.5	Metástases de Carcinoma Mamário	15
3.6	Citoqueratinas	17
3.7	Imunohistoquímica	17
4	METODOLOGIA	19
4.1	Seleção dos animais do estudo	19
4.2	Processamento das amostras dos tumores e linfonodos	19
4.3	Imunohistoquímica	20
4.4	Análise estatística	21
4.5	Acompanhamento dos animais	21
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
6	CONCLUSÃO	29
	REFERÊNCIAS	30

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias mamárias são comumente diagnosticadas em cadelas (GOLDSCHMIDT et al., 2017) com ocorrência duas a três vezes maior na espécie canina quando comparado com humanos (CASSALI, 2000). Cerca de 50% dos tumores mamários em cães (TMC) são malignos (SORENMO, 2013), porém no Brasil a incidência é maior, com cerca de 90% dos TMC malignos (GAMBA et al., 2017).

Vários fatores têm sido propostos para determinação do prognóstico de cadelas com tumor de mama, entre eles contagem mitótica (CASSALI, 2017) graduação histológica (GUNDIM et al., 2016; CASSALI, 2017) e sistema TNM (OWEN, 1980; CASSALI, 2017).

O sistema TNM considera a presença de células tumorais em linfonodos regionais como um dos parâmetros para o estadiamento clínico de tumores mamários em cadelas (OWEN, 1980; COLETO et al., 2018). O *status* do linfonodo é considerado o fator prognóstico mais importante em mulheres com câncer de mama (PÉREZ-CALLEJO et al., 2015), com relevantes implicações para o tratamento. Do mesmo modo, em cadelas a análise dos linfonodos é de extrema importância para o estadiamento das neoplasias mamárias e para o prognóstico do animal (CASSALI, 2017).

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.

Com o avanço da técnica do linfonodo sentinela em medicina humana, que consiste na minuciosa avaliação dos linfonodos e emprego da Imunohistoquímica (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 células tumorais isoladas (CTI) e micrometástases ocultas (MIC).

Atualmente, há vários questionamentos acerca do significado clínico das CTI e das MIC em mulheres (DE BOER et al., 2010; AHMED et al., 2014; NOWIKIEWICZ et

al, 2015). Existem estudos em que não foram relatados tempos de sobrevida menores em mulheres com linfonodo micrometastático e/ou na presença de CTI (GOBARDHAN et al., 2011; MAASKANT – BRAAT et al., 2011). Por outro lado, também existem autores que relataram diminuição na sobrevida livre de doença (SLD) em pacientes com aglomerados tumorais maiores que 0,5 mm advindos de carcinomas ductais invasivos (CUMMINGS et al., 2002), e ainda relataram menores tempos de sobrevida em pacientes jovens com aglomerados tumorais de até 0,2 mm (REED et al., 2004).

Todavia, o significado clínico do tipo de metástase presente nos linfonodos ainda é indefinido na espécie canina (COLETO et al., 2018). Também não existem estudos avaliando a influência da localização das metástases no linfonodo na sobrevida. 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 em cadelas.

2 OBJETIVO

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da técnica de IHQ na pesquisa de CTI e micrometástases ocultas em comparação à técnica convencional de avaliação microscópica em lâminas coradas em Hematoxilina e Eosina (HE), em linfonodos de cadelas portadoras de carcinomas mamários; verificar a relação entre tamanho tumoral, tipo histológico, grau histológico e o tipo de metástase e sua localização no linfonodo; e ainda, avaliar a sobrevida de cadelas portadoras de carcinomas mamários com metástases em linfonodo regional.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Epidemiologia das Neoplasias Mamárias em Cadelas

As neoplasias mamárias são comumente diagnosticadas em cadelas (GOLDSCHMIDT et al., 2017) encontrando-se duas a três vezes mais frequentes na espécie canina em relação aos humanos (CASSALI, 2000). Cerca de 50% dos tumores mamários em cães (TMC) são malignos (SORENMO, 2013), porém no Brasil a incidência é maior, com cerca de 90% dos TMC malignos (GAMBA et al., 2017).

De acordo com Salas et al. (2015), por volta de 50% dos TMC são encontrados em raças de pequeno porte, sendo o Poodle e o Cocker Spaniel as raças mais frequentemente acometidas. Em segundo plano, as raças de médio porte, com aproximadamente 30% de ocorrência. Nesta categoria os animais sem raça definida (SRD) e os da raça Beagle são as mais acometidas. As raças de grande porte têm a mais baixa frequência de ocorrência, com cerca de 20%. As principais raças neste grupo são o Pastor Alemão, o Labrador Retriever e o Rottweiler. Vale ressaltar que, a ocorrência de TMC em cães de raças puras é muito maior em relação aos cães SRD, com 80% e 20%, respectivamente.

Quanto à idade dos animais, cadelas adultas, ou seja, entre nove e 12 anos foram as mais acometidas, seguidas pela faixa etária entre cinco e oito anos. Essas duas faixas juntas, representam mais de 70% dos acometimentos de TMC (SALAS et al., 2015)

3.2 Histologia das Neoplasias Mamárias

Os tumores de mama são classificados de acordo com o tipo histológico, sendo eles os adenomas e papilomas (benignos) e carcinomas (malignos), quando originados de células epiteliais; sarcomas, quando tem origem de células mesenquimais, e carcinosarcomas, quando a origem é de ambos os tipos celulares (MISDORP, 2002; GOLDSCHMIDT et al., 2017).

Dentre as classificações dos TMC utilizadas na medicina veterinária, duas são as mais aplicadas, a primeira proposta pela Organização Mundial da Saúde (MISDORP et al., 1999) e a segunda, mais recente, proposta por Goldschmidt et al. em 2017 (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação histológica dos TMC, por MISDORP et al. (1999) e GOLDSCHMIDT et al. (2017)

	MISDORP et al. (1999)	GOLDSCHMIDT et al. (2017)
Tumores Benignos	Adenomas <ul style="list-style-type: none"> • Simples • Complexo • Basaloide 	Adenomas <ul style="list-style-type: none"> • Simples • Intraductal Papilar • Ductal
	Fibroadenoma <ul style="list-style-type: none"> • Alta Celularidade • Baixa Celularidade 	Fibroadenoma
	Tumor Misto Benigno	Tumor Misto Benigno
	Papiloma Ductal	Adenomioepitelioma
Tumores Malignos	Carcinoma infiltrante (<i>in situ</i>)	Carcinoma <i>in situ</i>
	Carcinoma Complexo	Carcinoma complexo
	Carcinomas simples <ul style="list-style-type: none"> • Tubulopapilar • Sólido • Anaplásico 	Carcinomas simples <ul style="list-style-type: none"> • Tubulopapilar • Tubular • Papilar Cístico • Cribiforme
		Carcinoma Micropapilar invasivo
		Carcinoma Sólido Comedocarcinoma
		Carcinoma Anaplásico
	Carcinoma em adenoma complexo/tumor misto	
	Carcinoma e maligno mioepitelioma	
	Carcinoma misto	
	Carcinoma Ductal	
	Carcinoma Papilar intraductal	

Tipos especiais de carcinomas	Carcinoma de células escamosas	Carcinoma de células escamosas
	Carcinoma mucinoso	Carcinoma mucinoso
	Carcinoma rico em lipídio	Carcinoma rico em lipídio (secretório)
	Carcinoma de células fusiformes	Carcinoma adenoescamoso Carcinoma de células fusiformes <ul style="list-style-type: none"> • Mioepitelioma maligno • Carcinoma de células escamosas -variante de células fusiformes • Carcinoma - variante de células fusiformes
		Carcinoma inflamatório
	Carcinossarcoma	Carcinossarcoma
Sarcomas	Fibrossarcoma	Fibrossarcoma
	Osteossarcoma	Osteossarcoma
		Condrossarcoma
		Hemangiossarcoma
	Outros sarcomas	Outros sarcomas

Os parâmetros mais significativos no diagnóstico dos TMC, em cortes histológicos corados por hematoxilina-eosina são: pleomorfismo celular, pleomorfismo nuclear, números de mitoses por campo, padrão arquitetônico, presença de áreas de necrose, células tumorais em vasos linfáticos e metástases em linfonodo (GOLDSCHMIDT et al., 2017).

3.3 Grau Histológico

O sistema Nottingham para graduação de tumores, modificado por Elston e Ellis (1991), pode ser utilizado na Medicina Veterinária (CASSALI et al., 2014). A partir desse método, classificam-se os carcinomas mamários em graus, de acordo com a pontuação obtida observando três aspectos microscópicos. O primeiro é a formação

de túbulos, sendo mais de 75% equivalente a um ponto, entre 10% e 75%, dois pontos e 10% ou menos, três pontos. O segundo é o pleomorfismo nuclear, no qual pequenos e regulares, obtém um ponto, moderado aumento com variação, dois pontos e marcado pleomorfismo com variação grande de forma e tamanho, três pontos. E em terceiro o número de mitoses por campo de grande aumento, a observação de zero a oito mitoses, representam um ponto, de nove a 16 mitoses, dois pontos e acima de 17 mitoses, três pontos.

A classificação do carcinoma se dá pela somatória dos pontos. Grau I, com pontuação entre três a cinco, Grau II, com pontuação de seis ou sete e Grau III, pontuação de oito ou nove.

Rasotto et al. (2017) em seu estudo, constataram que os carcinomas mamários foram classificados em sua maioria como Grau I (51%), seguido por Grau III (35%) e em menor ocorrência Grau II (14%). Carcinomas em tumores mistos benignos, carcinomas complexos, carcinomas tubulares simples, carcinomas tubulopapilares simples, carcinomas papilíferos intraductais, mioepiteliomas malignos e carcinossarcomas foram em sua maioria classificados como Grau I, enquanto carcinomas adenoescamosos, comedocarcinomas, carcinomas sólidos e carcinomas anaplásicos foram geralmente Grau III

3.4 Sistema TNM

O estadiamento clínico de cadelas com tumor na glândula mamária utiliza o sistema TNM, proposto pela Organização Mundial de Saúde (OWEN, 1980). O sistema TNM, baseia-se na avaliação de três fatores: a extensão do tumor primário (T), a condição dos linfonodos regionais (N) e a presença de metástases distantes (M). Nos casos em que se há múltiplos tumores, esses devem ser analisados individualmente.

Sobre o T, classifica-se como T0, quando não há nenhuma evidência de tumor.

T1, tumores menores que 3cm de diâmetro, sendo T1a não aderido, T1b aderido à pele e T1c aderido ao músculo.

T2, tumores com diâmetro entre 3 e 5 cm, sendo T2a não aderido, T2b aderido à pele e T2c aderido ao músculo.

T3, tumores maiores que 5cm de diâmetro, sendo T3a não aderido, T3b aderido à pele e T3c aderido ao músculo.

T4 Carcinoma Inflamatório de qualquer tamanho

Em relação ao N, N0 é dado quando não há envolvimento dos linfonodos regionais.

N1, quando há envolvimento do linfonodo regional ipsilateral, sendo N1a não aderido e N1b aderido

N2, quando há envolvimento bilateral dos linfonodos regionais, sendo N2a não aderidos e N2b aderidos

A respeito do M, atribui-se M0, quando não há presença de metástases à distância e M1, quando há presença de metástases a distância

O estadiamento é dado analisando os três critérios juntos, resultando em quatro estádios (Tabela 2).

Tabela 2. Estadiamento dos TMC usando o sistema TNM (OWEN, 1980)

Estádio	T	N	M
I	T1a T1b T1c	N0 N1a N2a	M0
	T0	N1	M0
II	T1a T1b T1c	N1	
	T2a T2b T2c	N0 N1a	
III	Qualquer T3	Qualquer N	M0
	Qualquer T	Qualquer Nb	
IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

3.5 Metástases de Carcinoma Mamário

Os TMC utilizam diferentes rotas de disseminação tumoral. Os sarcomas normalmente se propagam em veias e capilares, já os carcinomas se espalham através da via linfática. 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).

Os depósitos tumorais são classificados em células tumorais isoladas (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 hematoxilina e eosina ou imunohistoquímica (IHQ). São consideradas micrometástases (MIC) aglomerados de células tumorais

entre 0,2 e 2,0 mm e/ou mais de 200 células. Já as macrometástases (MAC) são aglomerados de células tumorais maiores que 2,0 mm (GREENE et al., 2002; EDGE et al., 2009).

Vale ressaltar que TMC maiores apresentaram metástases com maior frequência (CHANG et al., 2005; OLIVEIRA FILHO et al., 2010, COLETO et al., 2018).

De acordo com o *National Cancer Data Base*, a Sobrevida Global (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, além de significativa redução da sobrevida específica para o câncer de mama, não observando o mesmo para CTI.

Em cadelas 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). Atualmente, a biópsia do linfonodo sentinela (LS) é a técnica padrão para o estadiamento de mulheres com câncer de mama 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-sentinela), tais como hematomas, linfedema crônico, seroma e infecções (GIULIANO et al., 2000).

Kurzman e Gilbertson (1986) e Yamagami et al. (1996), relataram que a taxa de sobrevida no período de dois anos pós-cirurgia foi menor em cadelas com metástases em linfonodos. 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 e Lopuszynski (2011) relataram menores tempos de sobrevida global 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 sobrevida e invasão linfovascular e metástase para o linfonodo.

As CTI foram mais observadas na região medular do linfonodo e as MIC e MAC na região cortical. (COLETO et al, 2018). Em cadelas metástases maiores que 7,32 mm levaram a um tempo menor de sobrevida, o que não foi observado com MIC (DE ARAÚJO et al., 2015). A presença de CTI no linfonodo não foi associada a pior prognóstico (COLETO et al, 2018).

É interessante notar que os tumores grau I e grau II se comportaram de maneira semelhante, estando ambos associados a uma SG prolongada. A sobrevida em um ano foi de 81% para os TMC Grau I e 96% para os Grau II. E a sobrevida em dois anos para os Grau I foi de 69% e para os Grau II 78% (RASOTTO et al., 2017)

3.6 Citoqueratinas

As citoqueratinas (CK) são proteínas que estão no epitélio das glândulas mamárias normais de humanos, cães e gatos. As CK são divididas em baixo peso molecular, entre elas, CK7, CK8, CK18 e CK19, presentes nas células epiteliais no lúmen e alto peso molecular, que incluem, CK5, CK6, CK14 e CK17, presentes nas células mioepiteliais, localizadas na região basal. Mesmo com o desenvolvimento tumoral, a expressão das citoqueratinas persiste, o que as tornam bons marcadores tumorais (SORENMO et al., 2011; GOLDSCHMIDT et al., 2017).

Em humanos é comum a utilização de citoqueratina para detectar MIC e CTI ocultas em linfonodos regionais. É possível a análise do prognóstico de SLD e SG de mulheres que passaram por linfadenectomia (SORENMO et al., 2011).

3.7 Imunohistoquímica

A detecção de micrometástases e CTI é muito difícil em cortes histológicos corados por hematoxilina-eosina, principalmente pela densidade celular do parênquima do linfonodo (MIYAKE et al., 2001). De acordo com De Boer et al. (2010) a avaliação dos linfonodos e uso da IHQ, permite identificar aglomerados com células tumorais menores que 2,0 mm. O que possibilita a visualização de MIC e CTI.

O intuito da IHQ é a identificação de antígenos celulares e assim se poder classificar e identificar tipos celulares específicos em uma população (CAPELOZZI, 2009). Nesta técnica, utiliza-se um coquetel, denominado pan-citoqueratina, que é composto por mais de 20 anticorpos. (RAMOS-VARA E BORST, 2017). Uma série de autores utilizam o clone AE1/AE3 de pan-citoqueratina ao avaliar metástases em linfonodo (MATOS et al., 2006; SZCZUBIAL & LOPUSZYNSKI, 2011; AHMED et al.,

2014; COELHO et al., 2014; DE ARAÚJO et al., 2015), sendo este o mais utilizado na medicina humana (DOKI et al., 2002).

A utilização da técnica de IHQ aumentou em cerca de 35% a localização de CTI ocultas, e por volta de 3% na detecção de MIC ocultas, quando comparado com o exame histopatológico (COLETO et al., 2018)

4 METODOLOGIA

4.1 Seleção dos animais do estudo

Foram selecionadas 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 janeiro de 2017 a dezembro de 2018.

As cadelas foram avaliadas clinicamente e submetidas a 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 médico 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 foram utilizados como critérios de inclusão de cadelas no estudo: serem portadoras de carcinomas mamários com seus respectivos linfonodos drenantes excisados durante o procedimento cirúrgico, de acordo com Macphail (2015). Quando a cadela possuir somente um nódulo neoplásico maligno este deverá estar acompanhado do linfonodo drenante. Nas cadelas que possuíam mais de um nódulo neoplásico maligno, com tipos histológicos diferentes, foi considerado o tipo histológico mais agressivo, de acordo com Misdorp et al. (1999) e o nódulo deverá estar acompanhado do linfonodo drenante.

Foi utilizado o sistema TNM modificado por Sorenmo et al. (2013) para o estadiamento clínico das cadelas. Após a IHQ, quando necessário, as cadelas foram reestadiadas.

4.2 Processamento das amostras dos tumores e linfonodos

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 4µm coradas pela técnica de HE. O diagnóstico foi realizado em estudo duplo cego por dois patologistas segundo Goldschmidt et al. (2017). O grau histológico será atribuído de acordo com o sistema Nottingham modificado por Elston e Ellis (1991).

A localização da metástase no linfonodo foi avaliada e agrupada em: (1) linfonodos com metástase no seio subcapsular (2) linfonodos com metástase nos seios peritrabeculares, (3) linfonodos com metástase na zona paracortical, (4) linfonodos com metástase nos seios medulares.

4.3 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 E MEUTEN, 2017).

Fragmentos de linfonodo incluídos em parafina foram seccionados e cortes de 4µm utilizados para pesquisa de células tumorais em linfonodos pela técnica de IHQ, utilizando o método de Hsu et al. (1981) modificado. As lâminas foram desparafinizadas e a recuperação antigênica realizada em panela de pressão, utilizando tampão citrato (pH 6,0). Em seguida foi realizado 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 biotilado e streptavidina peroxidase (kit LSAB - Dako®). As lâminas foram 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.

O controle positivo foi glândula mamária normal e linfonodos com macrometástase. Como controle negativo, foi substituído o anticorpo primário pelo diluente do anticorpo (BSA 1%). Foi considerado imunomarcção para citoqueratina

o padrão de coloração intracitoplasmática (Ramos-Vara e Borst, 2017). Na presença de mais de um foco, foi considerado para a classificação das células tumorais o foco que possuir 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®).

4.4 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) será a IHQ e o teste investigado para comparação o histopatológico com coloração de hematoxilina e eosina.

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, tipo histológico, grau histológico e presença de células neoplásicas em linfonodo, além de verificar a relação entre estas variáveis e o tipo de metástase. Quando valor de p for de 0,01 a 0,19 a correlação foi considerada muito baixa, entre 0,20 a 0,39 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).

4.5 Acompanhamento dos animais

As cadelas foram agrupadas em: animais com CTI ocultas, animais com micrometástases, animais com macrometástases e animais com linfonodos livres. O Método de Kaplan-Meier foi utilizado no cálculo da curva de sobrevivência, 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 $p < 0,05$. A SG foi definida como o período em dias desde a data do procedimento cirúrgico até a data da morte pela doença. Os animais que estiverem vivos foram censurados

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram selecionadas 28 cadelas portadoras de carcinoma mamário, sendo que oito (28,6%) tinham idade inferior a oito anos, 15 (53,6%) eram idosas, ou seja, possuíam idade igual ou superior a oito anos e cinco (17,8%) não tiveram idade informada. A média de idade foi $8,37 \pm 2,86$ anos, variando entre quatro e 15 anos (Tabela 3).

Os carcinomas mamários são diagnosticados frequentemente em cadelas com idade mais avançada, assim como relatado por Sorenmo et al. (2013), que demonstraram uma ocorrência maior de neoplasias mamárias em cadelas com idade entre 9 e 11 anos; Goldschmidt, Peña e Zappulli (2017) entre 7 e 13 anos e Nguyen et al. (2018) que relataram idade média de 11 anos.

As cadelas SRD representaram 53,6% (15/28) dos animais estudados (Tabela 3). Matos et al. (2006) descreveram 52,5% das cadelas SRD, Coelho (2014) 45% e Coletto et al. (2018) 50,8% em seus estudos.

Quanto as raças, três (10,7%) eram Poodle, três (10,7%) Pinscher, duas (7,1%) Pit Bull, uma (3,6%) Cocker Spaniel e uma (3,6%) Teckel. Salas et al. (2015) relataram 48,4% dos TMC em raças de pequeno porte. Coelho (2014), De Araújo et al. (2015) e Nguyen et al. (2018) ressaltam que a raça Poodle, é a mais frequentemente acometida com (21,5%), (32%) e (14,3%), respectivamente

Em relação ao tamanho dos nódulos neoplásicos 17 (60,7%) apresentaram tamanho menor que 3cm (Tabela 1). Igualmente, Nunes (2015) relatou que 56% dos animais apresentaram tumores menores que 3cm, bem como Cassali (2019) (76,4%).

As mamas inguinais foram a mais acometidas com 46,4% (13/28) (Tabela 3). No entanto, a localização do nódulo tumoral na cadeia mamária não parece ter relação com o comportamento tumoral (QUEIROGA E LOPES, 2002).

A maior frequência de nódulos tumorais nas mamas abdominais caudais e inguinais (MISDORP, 2002; HEDLUND, 2005; COLETO et al., 2018) está associada à maior quantidade de parênquima mamário nesta região (QUEIROGA E LOPES, 2002; MISDORP, 2002)

O tipo histológico com maior frequência foi o carcinoma complexo (42,85 - 12/28), destes um apresentava-se com áreas de carcinoma micropapilar (Tabela 3). Rasotto et al. (2017) e Coletto et al. (2018) também verificaram maior frequência de carcinoma complexo dentre os tumores malignos, com frequências de 10% e 53,2%,

respectivamente. Cassali (2019) por outro lado, encontrou o carcinoma em tumor misto como mais frequente (75%).

Em relação ao grau histológico, 16 (57,2%) cadelas receberam graduação I. Rasotto et al. (2017) relatou prevalência de 51% de tumores grau I, do mesmo modo Coelho (2014) com 70,6%.

Tabela 3 - Variáveis clínico patológicas associadas as cadelas portadoras de carcinomas mamários.

Características	n (%)
Idade	
< 8 anos	8 (28,6%)
≥ 8 anos	15 (53,6%)
Não Informado	5 (17,8%)
Raça	
SRD	15 (53,6%)
Poodle	3 (10,7%)
Pinscher	3 (10,7%)
Pit Bull	2 (7,1%)
Cocker Spaniel	1 (3,6%)
Teckel	1 (3,6%)
Não Informado	3 (10,7%)
Tamanho tumoral	
T1 (< 3 cm)	17 (60,7%)
T2 (3 a 5 cm)	3 (10,7%)
T3 (> 5 cm)	7 (25%)
Não Informado	1 (3,6%)
Localização	
Inguinal	13 (46,4%)
Abdominal caudal	7 (25%)
Abdominal cranial	7 (25%)
Torácica caudal	1 (3,6%)
Torácica cranial	0 (0%)
Tipo Histológico	
Carcinoma Complexo	12 (42,85%)
Carcinoma em Tumor Misto	7 (25%)
Carcinoma Tubulopapilar	5 (17,85%)
Carcinoma Sólido	2 (7,1%)
Carcinoma Tubular	1 (3,6%)
Carcinoma Inflamatório	1 (3,6%)
Grau histológico	
I	16 (57,2%)
II	10 (35,7%)
III	2 (7,1%)

Dentre os linfonodos coletados, 92,9% (26/28) foram classificados com livres de células tumorais no exame histopatológico e em somente dois (7,1%) foram detectadas metástases (Tabela 4).

Na avaliação imunohistoquímica, constatou-se que 7,1% (2/28) linfonodos continham macrometástases, 14,3% (4/28) possuíam micrometástases e 78,6% (22/28) estavam livres de células tumorais (Tabela 4).

Após avaliação imuno-histoquímica, foram calculados os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da avaliação histopatológica e os valores obtidos foram: 34%, 100%, 100% e 84%, respectivamente. A acurácia foi de 85%. Beserra (2014) encontrou sensibilidade de 94,7% e especificidade igual a 100%, além de acurácia de 97,5% e valor preditivo positivo 100% e preditivo negativo de 100% e 95,6%. A baixa sensibilidade do histopatológico, nos é um indicativo da importância da IHQ como metodologia diagnóstica.

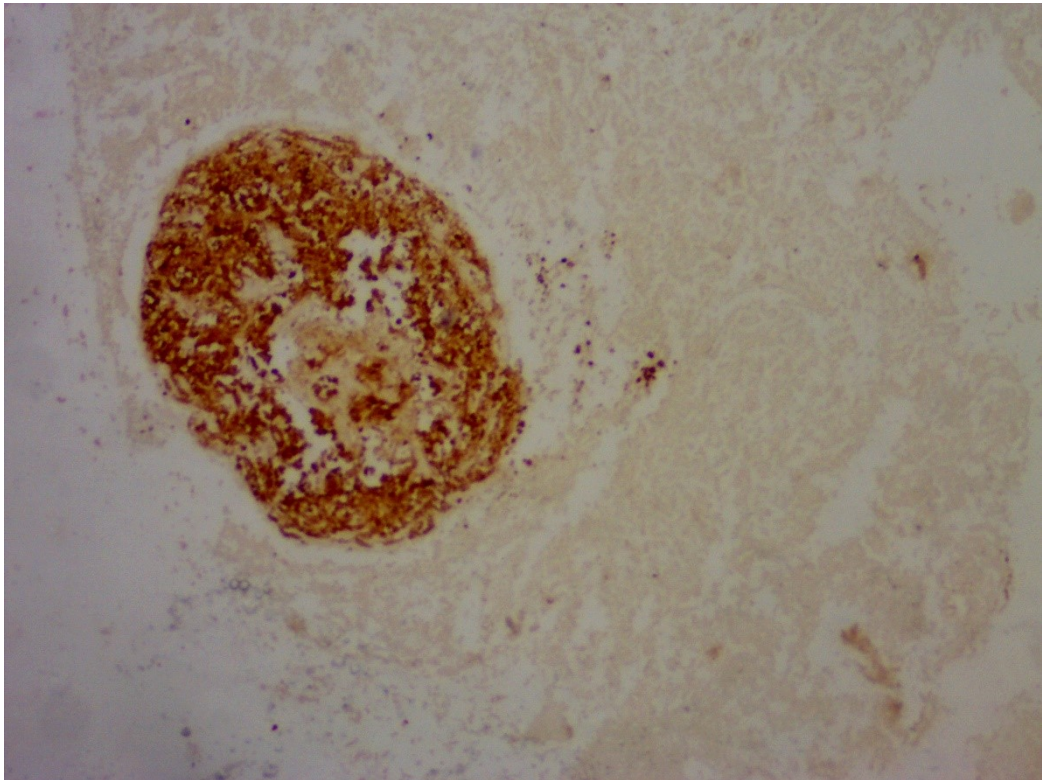
Tabela 4 - Relação Histologia x Imunohistoquímica

		Doença (IHQ)	
		Positivo	Negativo
Teste (Histologia)	Positivo	2	0
	Negativo	4	22

Quanto à localização das metástases, em 33,3% (2/6) estavam distribuídas pelo parênquima dos linfonodos (Figura 1), 50% (3/6) apresentavam metástases no seio subcapsular e 16,7% (1/6) possuía dois focos metastáticos sendo um deles no seio subcapsular e outro no seio peritrabecular (Figura 2)

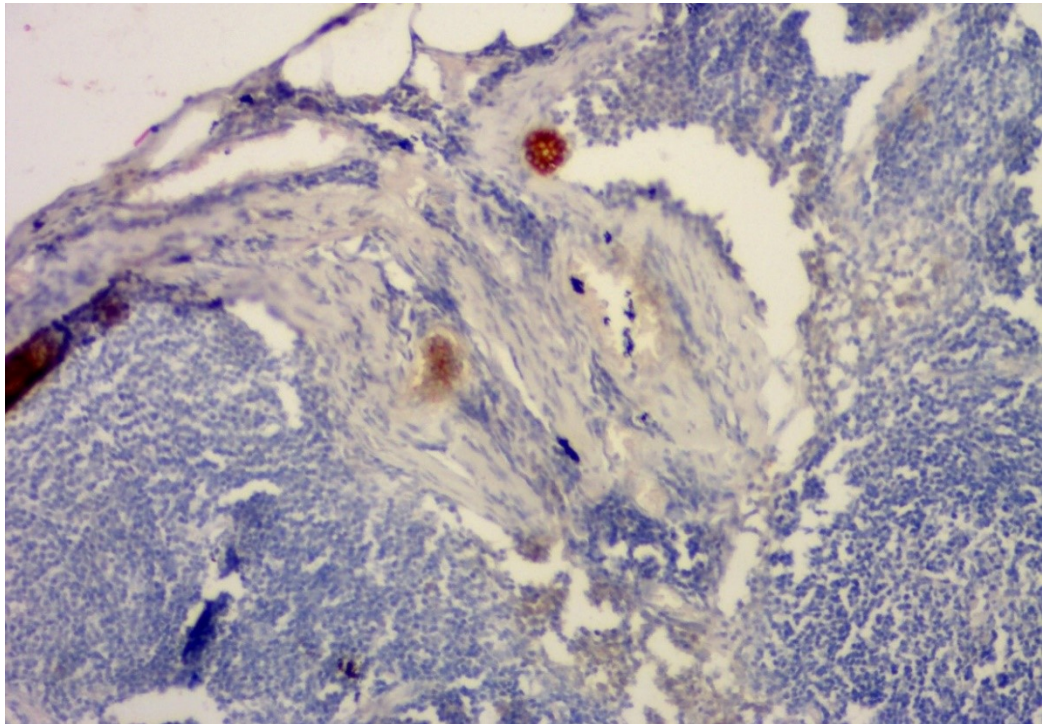
Neste estudo houve baixa correlação entre o tamanho dos tumores com a presença de metástases ($p= 0,04$). Coletto et al. (2018) em contrapartida encontraram uma boa correlação ($p= 0,77$), com maior acometimento de metástases em cadelas com tumores maiores.

Figura 1- Fotomicrografia de linfonodo de cadela portadora de carcinoma complexo grau II. Macrometástase localizada no parênquima linfonodal, expressando AE1/AE3. IHQ. Objetiva 4x. Contracoloração com Hematoxilina de Harris.



Fonte: Laboratório de Patologia Animal do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia

Figura 2- Fotomicrografia de linfonodo de cadela portadora de carcinoma tubular grau I. Micrometástase localizada em seio medular, expressando AE1/AE3. IHQ. Objetiva 4x. Contracoloração com Hematoxilina de Harris.

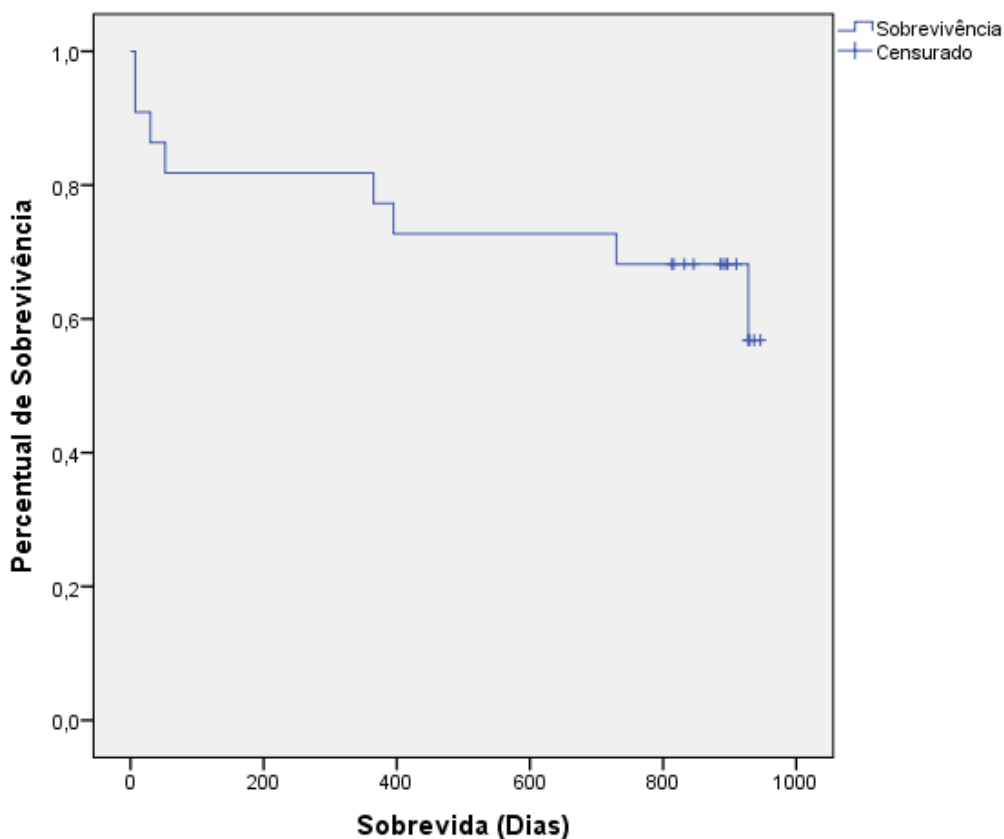


Fonte: Laboratório de Patologia Animal do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia

Em relação a presença de metástases e o grau histológico do tumor, a correlação de Spearman foi negativa ($p = -0,259$), o que nos indica que a presença de metástases ocorreu mais em tumores classificados como Grau I e Grau II. Rasotto et al. (2012), Coelho (2014) e Coletto et al. (2018), encontraram maior frequência de metástases em cadelas cujos TMC eram classificados em Grau III.

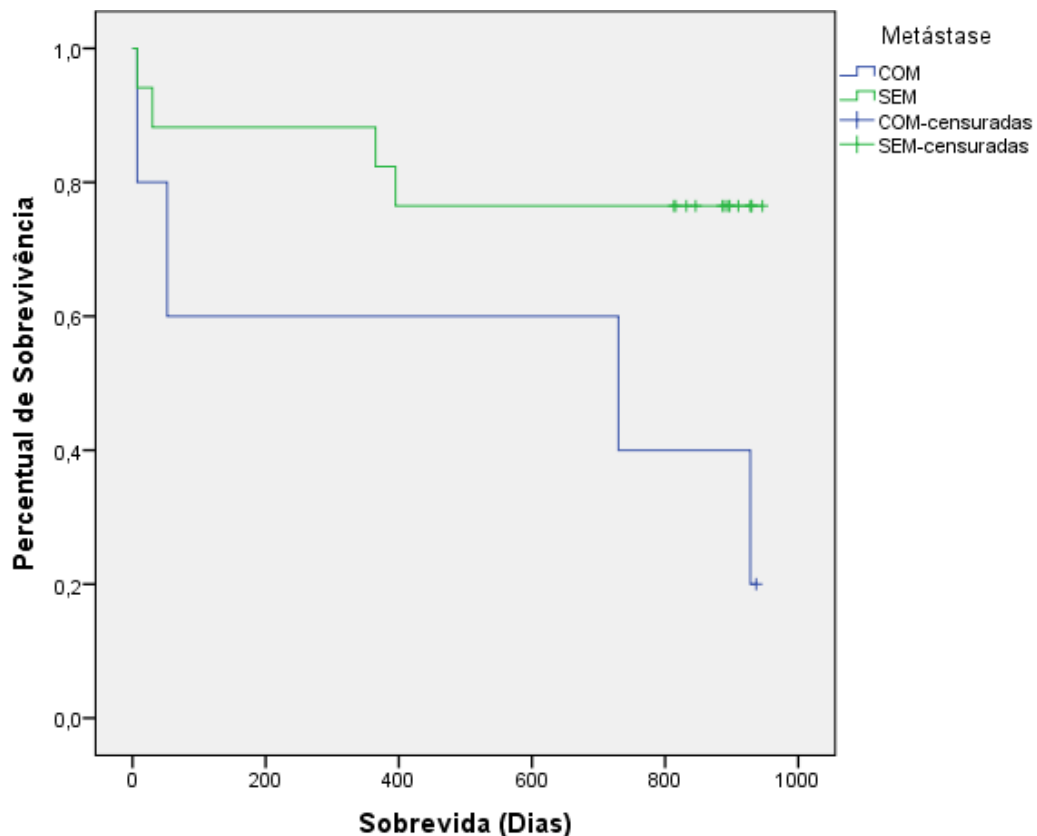
Para a análise da sobrevida global das cadelas pelo método de Kaplan-Meier, foi possível acompanhar 22 (78,6%) animais. A sobrevida global média das cadelas portadoras de carcinoma mamário foi de 715 ± 78 dias (Figura 3). As cadelas sem metástases (17) apresentaram média de sobrevida de 770 ± 80 dias e alcançaram a mediana de sobrevivência. As cadelas que possuíam metástase, a média de sobrevida foi de 530 ± 186 dias e mediana de 730 dias (Figura 4).

Figura 3 - Curva de sobrevida global Kaplan-Meier de cadelas portadoras de tumores mamários malignos ($n=22$). Tempo médio de sobrevida de 715 ± 78 dias. As cadelas não atingiram mediana de sobrevivência.



De acordo com Chang et al. (2005) o tempo médio de sobrevivência de cadelas com tumores mamários malignos foi de 426 dias \pm 264 dias, variando de 30 – 720 dias. De Araújo et al. (2015) descreve que animais com metástase possuem tempo de sobrevivência menor (média, 253.9 \pm 244.2 dias e mediana, 275 dias) em comparação a animais sem metástase (média 530.6 \pm 286.8 dias e não atingiram a mediana de sobrevivência. Kurzman; Gilbertson (1986) e Yamagami et al. (1996) descreveram que animais portadores de TMC sem a presença de metástases possuem tempo de sobrevivência maior comparados aos animais que possuem metástases regionais ou à distância. Sorenmo (2003) também descreve que animais com metástases em linfonodos regionais exibem uma diminuição significativa na expectativa de sobrevivência em comparação com indivíduos que tiveram resultados negativos para metástase linfonodal.

Figura 4- Curvas de sobrevivência Kaplan-Meier de cadelas com tumores mamários malignos sem metástases e com presença de metástases em linfonodo.

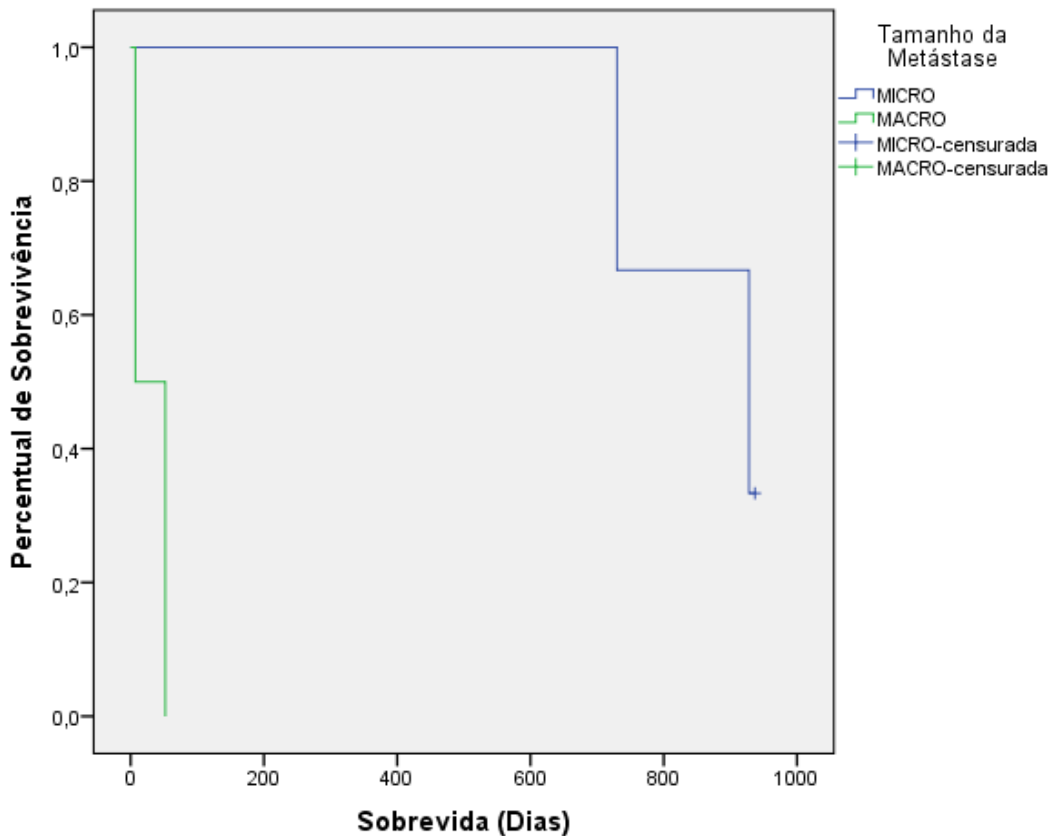


A média de sobrevivência dos animais que possuíam metástases em linfonodo foi menor comparada aos que não possuíam (Log Rank $p=0,048$, Breslow $p=0,097$ e Tarone-Ware $p=0,071$)

Analisando somente as cadelas que possuíam metástase (6/28) cinco cadelas foram acompanhadas e observou-se que cadelas com metástases menores (MIC) possuem tempo de sobrevida maior (média 865 ± 55 dias) que as cadelas que possuíam metástases maiores (média 29 ± 22 dias) (Figura 5).

Animais com MAC (média 248.8 ± 277.8 dias e mediana, 240 dias) tiveram menor tempo de sobrevivência do que aqueles sem metástase (média 497.6 ± 238.37 dias e não atingiram a mediana de sobrevivência) e aqueles com MIC (média 342.9 ± 238.9 e não atingiram a mediana de sobrevivência) (DE ARAÚJO, 2015).

Figura 5- Curvas de sobrevida Kaplan-Meier de cadelas com tumores mamários malignos com micrometástases (média 865 ± 109 dias) e macrometástases (média 29 ± 44 dias).



6 CONCLUSÃO

Com base neste trabalho conclui-se que a técnica de imunohistoquímica é eficaz na detecção de metástases ocultas, aumentando as taxas de marcação em relação ao exame histopatológico. Houve baixa correlação entre o tamanho dos tumores e a presença de metástases. Cadelas que possuem metástase tem sobrevida menor que as cadelas que não possuem e as cadelas com macrometástases possuem sobrevida menor que as que possuem micrometástases. Quanto a localização das metástases, essas foram encontradas mais frequentemente no seio subcapsular dos linfonodos.

Ainda existem poucos estudos que correlacionam metástases em linfonodo e também que abordam a sobrevida de cadelas portadoras de carcinoma mamário. Para isto, sugere-se que sejam feitos novos estudos a respeito.

REFERÊNCIAS

AHMED SS, THIKE AA, IQBAL J, YONG WS, TAN B et al. 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.

BESERRA,H. Metástases de carcinoma de mama em cadelas: Avaliação da técnica de linfonodo sentinela. Dissertação de mestrado., Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

CALLEGARI-JACQUES SM. **Bioestatística: princípios e aplicações**, Porto alegre, 2003, p. 255.

CAPELOZZI, V.L. Papel da imuno-histoquímica no diagnóstico do câncer de pulmão. **J Bras Pneumol**, v. 35, n. 4, p. 375-382, 2009.

CASSALI, G. D.; LAVALLE, G. E.; FERREIRA, E.; ESTRELA-LIMA, A.; DE NARDI, A.B.; GHEVER, C.; SOBRAL, R. A.; AMORIM, R.L.; OLIVEIRA, L. O.; SUEIRO, F. A.R.; BESERRA, H. E. O.; BERTAGNOLLI, A. C.; GAMBA, C. O.; DAMASCENO, K. A.;CAMPOS, C. B.; ARAUJO, M. R.; CAMPOS, L. C.; MONTEIRO, L. N.; NUNES, F. C.;HORTA, R. S.; REIS, D. C.; LUVIZOTTO, M. C. R.; MAGALHÃES, G. M.; RAPOSO, J. B.; FERREIRA, A. M. R.; TANAKA, N. M.; GRANDI, F.; UBUKATA, R.;BATSCHINSKI, K.; TERRA, E. M.; SALVADOR, R. C. L.; JARK, P. C.; DELECRODI,J. E. R.; NASCIMENTO, N. A.; SILVA, D. N.; SILVA, L. P.; FERREIRA, K. C. R. S.;FREHSE, M. S.; DI SANTIS, G. W.; SILVA, E. O.; GUIM, T. N.; KERR, B.; 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.

CASSALI, G.D (editor). **Patologia mamária canina: do diagnóstico ao tratamento**. São Paulo: Medvet, 2017.

CHANG, S.; CHANG, C.; CHANG, T.; Wong, M. 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**, v. 227, n. 10, p. 1625-1629, 2005.

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.

COLETO, A. F. Metástases de carcinomas mamários em linfonodos de cadelas: variáveis clínico-patológicas e estudo imunohistoquímico . 2017.53 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.**

COLETO, A.F. ; WILSON, T.M. ; SOARES, N.P. ; GUNDIM, L.F. ; CASTRO, I.P. ; GUIMARÃES, E.C. ; BANDARRA, M.B. ; MEDEIROS-RONCHI, A.A. . Prognostic Value of Occult Isolated Tumour Cells within Regional Lymph Nodes of Dogs with Malignant Mammary Tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 158, p. 32-38, 2018.

CUMMINGS, M. C.; WALSH, M. D.; HOHN, B. G.; et al. 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.; et al. 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. et al. Cytokeratin deposits in lymph nodes show distinct clinical significance from lymph node micrometastasis in human esophageal cancers. **Journal of Surgical Research**, v. 107, p. 75-81, 2002.

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, p. 648.

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.

GAMBA, C. O.; FERREIRA, E.; SALGADO, B. S.; et al. Neoplasias malignas. In: CASSALI, G. D. **Patologia mamária canina, do diagnóstico ao tratamento**. São Paulo: Medvet, p. 91-116, 2017.

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.; et al. 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**. Wiley Blackwell, p.723-765, 2017.

GREENE, F. L.; PAGE, D. L, FLEMING, I. D, et al. Breast. In: greene fl, page dl, fleming id, fritz a, balch cm, haller dg, morrow m. **AJCC cancer staging manual**, 6. Ed. New York: springer, 2002, p. 223–240.

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.

HEDLUND, C.S. Cirurgia dos sistemas reprodutivos e genital. In: **Cirurgia de Pequenos Animais**, 2 Ed, TW Fossum, Ed., pp. 631-637., 2005

HSU, S. M.; FAINE, L.; FANGER, H. 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**, v. 75, n. 5, p. 734-738, 1981.

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, et al. 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.

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.; 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.

MISDORP, W.; ELSE, R. W., HELLMEN, E, LIPSCOMB, T.P. **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. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN, D. J. Tumors in Domestic Animals. 4. ed. Ames: Iowa State Press, 2002, 791p.

MIYAKE Y., YAMAMOTO H., FUJIWARA Y., OHUE M., SUGITA Y., TOMITA N., SEKIMOTO M., MATSUURA N., SHIOZAKI H., MONDEN M. Extensive micrometastases to lymph nodes as a marker for rapid recurrence of colorectal cancer: a study of lymphatic mapping. **Clinical Cancer Research**, v. 7, p. 1350-1357, 2001.

NGUYEN, F., PEÑA, L., IBISCH, C., LOUSSOUARN, D., GAMA, A., RIEDER, N., BELOUSOV, A., CAMPONE, M., ABADIE, J Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 1: natural history and prognostic factors. **Breast cancer research and treatment**, v. 167, n. 3, p. 635-648, 2018.

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.

NUNES, F. C. Diagnóstico, prognóstico e tratamento dos carcinomas de glândulas mamárias de cadelas atendidas no Hospital Veterinário da UFMG – Estudo retrospectivo (Dissertação). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, p. 1-75, 2015.

OLIVEIRA FILHO, J. C., KOMMERS, G. D., MASUDA, E. K., MARQUES, B. M., FIGHERA, R. A., IRIGOYEN, L. F. E BARROS, C. S. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 177-185, 2010.

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.

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.

QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos–Novas perspectivas. In: Congresso de ciências veterinárias, Oeiras. Proceedings of the Veterinary Sciences Congress, SPCV. p. 183-190. 2002.

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

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.

SALAS, Y.; MÁRQUEZ, A.; DIAZ, D.; ROMERO, L. Epidemiological Study of Mammary Tumors in Female Dogs Diagnosed during the Period 2002-2012: A Growing Animal Health Problem. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0127381, 2015.

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.

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

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.

TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. Barueri. 2. Ed. Barueri: editora manole, 2003, p. 331.

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.