

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

JÚLIA RABELO CRUVINEL

**AVALIAÇÃO DA DISSOCIAÇÃO CELULAR E CITOMORFOMETRIA EM
ESFREGAÇÕES CITOLÓGICOS DE TUMORES MAMÁRIOS CANINOS EM
RELAÇÃO A SOBREVIDA GLOBAL**

Uberlândia - MG

2024

JÚLIA RABELO CRUVINEL

**AVALIAÇÃO DA DISSOCIAÇÃO CELULAR E CITOMORFOMETRIA EM
ESFREGAÇÕES CITOLÓGICOS DE TUMORES MAMÁRIOS CANINOS EM
RELAÇÃO A SOBREVIDA GLOBAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Medicina Veterinária da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito parcial para obtenção do título de
bacharel em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Patologia Animal

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

Uberlândia – MG

2024

JÚLIA RABELO CRUVINEL

**AVALIAÇÃO DA DISSOCIAÇÃO CELULAR E CITOMORFOMETRIA EM
ESFREGAÇÕES CITOLOGICOS DE TUMORES MAMÁRIOS CANINOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Medicina Veterinária da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito parcial para obtenção do título de
bacharel em Medicina Veterinária

Área de concentração: Patologia Animal

Uberlândia, 14 de novembro de 2024.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi
Médica Veterinária / Docente FAMEV – UFU

Prof^a. Dr^a. Tatiane Furtado de Carvalho
Médica Veterinária / Docente FAMEV - UFU

M.V. Tainá Rodrigues Roque
Médica Veterinária

Dedico este trabalho aos meus pais, Kátia e Levy, que são meu alicerce. Essa conquista só é possível devido ao apoio de vocês desde o início.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por iluminar meus passos e por ser minha força e meu refúgio a cada dia.

Aos meus pais, Kátia e Levy, que me ensinaram a sempre dar o meu melhor e ser determinada, meus maiores exemplos de vida e de amor, que se dedicaram todos os dias para que eu chegassem até aqui e que são o motivo para eu me levantar todos os dias.

Aos meus irmãos Lucas e Vitor, que sempre foram meus exemplos e sempre estiveram ao meu lado.

Ao meu amado namorado Gabriel, que esteve ao meu lado em todos os momentos trazendo leveza e paz nos dias difíceis, seu amor alegra minha vida.

Agradeço à professora Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi, minha orientadora e grande inspiração para mim como médica veterinária patologista e pesquisadora, pela orientação durante a graduação, pelo apoio em cada momento.

A toda a minha família, que sempre confiaram no meu potencial.

Aos meus amigos, em especial Helena, que apesar da distância se faz presente na minha vida me apoiando e compartilhando memórias felizes. Aos amigos que tenho como parte da minha família em Paracatu e irmãos em Cristo, que sempre estiveram ao meu lado e me incentivaram desde o início. Aos novos amigos que fiz durante esse período em Uberlândia, que me acolheram e tornaram os dias aqui melhores. A Allyne que me incentivou em todos os momentos e sempre me apoiou quando precisei. A Milene por acreditar em mim e pelos momentos felizes.

À professora Tatiane Furtado de Carvalho e a médica veterinária Tainá Rodrigues Roque, por aceitarem participar da minha banca e confiarem no meu potencial.

Aos residentes do Laboratório de Patologia Animal que acompanharam o desenvolvimento deste trabalho e pelos ensinamentos durante meu período de estágio.

Finalmente, a todos os professores que fizeram parte de toda a minha formação, esse sonho está se concretizando devido a todos os ensinamentos até aqui e por me inspirarem a crescer a cada dia mais. Muito obrigada!

“Não to mandei eu? Se forte e corajoso;
não temas, nem te espantes, porque o
Senhor, teu Deus, é contigo por onde
quer que andares.”

(Josué, 1:9)

RESUMO

As neoplasias mamárias são os tipos de tumores mais frequentes em cadelas não castradas e o exame citológico é utilizado para triagem no diagnóstico pré-operatório de tumores mamários caninos (TMC), oferecendo vantagens pela facilidade e rapidez de execução, ser econômico e relativamente não invasivo. No entanto, há poucos estudos sobre a precisão diagnóstica e prognóstica do exame citológico no TMC. Um dos parâmetros que deve ser avaliado no exame citológico é a dissociação celular e não há estudos sobre a utilização deste parâmetro como indicador prognóstico em TMC. O presente estudo teve como objetivos avaliar a dissociação celular e os parâmetros morfométricos (área, perímetro e diâmetro) do núcleo das células tumorais em amostras citológicas de carcinoma mamário de cadelas atendidas no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), no período de janeiro 2020 a dezembro de 2022, e correlacioná-los com a graduação citológica de Robinson e presença de metástases, além de determinar se estes parâmetros podem ser utilizados como fatores de prognóstico para TMC. Foram selecionadas 75 cadelas com tumores mamários e realizada a análise das lâminas citológicas e histológicas desses pacientes disponíveis no acervo do Laboratório de Patologia Animal. A partir da análise de dissociação celular obteve-se que 51 (53,12 %) das amostras apresentaram escore de dissociação 1; 35 (36,46 %) escore 2 e 10 (10,42 %) escore 3. Houve diferença dos escores de dissociação 1 e 3 com a citologia ($p = 0,024$). Não houve diferença significativa dos escores de dissociação com a histologia ($p=0,564$). Não foi detectada diferença na associação da dissociação celular com a presença de metástases ($p>0,05$) e estádios ($p>0,05$). Como também não houve associação da curva de sobrevida com os escores de dissociação ($p=0,417$). Ademais, não houve associação dos parâmetros citomorfométricos do núcleo com o grau citológico ($p>0,05$) e entre os parâmetros citomorfométricos e os graus histopatológicos ($p>0,05$). Conclui-se que a dissociação celular permite identificar tumores de maior malignidade, porém não deve ser utilizada isolada como fator prognóstico, e a citomorfometria do núcleo é limitada para a determinação da malignidade dos TMC.

Palavras-chave: neoplasias mamárias. cão. punção aspirativa por agulha fina. prognóstico.

ABSTRACT

Mammary neoplasms are the most common types of tumors in uncastrated female dogs, and cytological examination is used for screening in the preoperative diagnosis of canine mammary tumors (CMT), offering advantages due to its ease and speed of execution, being economical and relatively non-invasive. However, there are few studies on the diagnostic and prognostic accuracy of cytological examination in CMT. One of the parameters that should be evaluated in cytological examination is cellular dissociation, and there are no studies on the use of this parameter as a prognostic indicator in CMT. The present study aimed to evaluate cellular dissociation and morphometric parameters (area, perimeter, and diameter) of the nucleus of tumor cells) in cytological samples of mammary carcinoma from female dogs treated at the Veterinary Hospital of the Federal University of Uberlândia (UFU) from January 2020 to December 2022 and correlate them with Robinson's cytological grading and the presence of metastases, in addition to determining if these parameters can be used as prognostic factors for CMT. Seventy-five female dogs with mammary tumors were selected, and the cytological and histological slides of these patients available in the Animal Pathology Laboratory collection were analyzed. From the analysis of cellular dissociation, it was found that 51 (53.12%) of the samples had a dissociation score of 1; 35 (36.46%) had a score of 2, and 10 (10.42%) had a score of 3. There was a difference in dissociation scores of 1 and 3 with cytology ($p = 0.024$). There was no significant difference in dissociation scores with histology ($p = 0.564$). No difference was detected in the association of cellular dissociation with the presence of metastases ($p>0.05$) and stages ($p>0.05$). Additionally, there was no association of the survival curve with dissociation scores ($p=0.417$). Furthermore, there was no association of nuclear cytomorphometric parameters with cytological grade ($p>0.05$) and between cytomorphometric parameters and histopathological grades ($p>0.05$). It is concluded that cellular dissociation can identify tumors of higher malignancy; however, it should not be used alone as a prognostic factor, and nuclear cytomorphometry is limited in determining the malignancy of CMT.

Keywords: breast neoplasms. dog. fine-needle aspiration cytology. prognosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Adaptação do Sistema de Graduação de Robinson's em cadelas. A 25
- Robinson's Escore 1, células com pleomorfismo médio, o nucléolo indistinto, o núcleo com margem irregular e cromatina com aspecto granular. B - Robinson's Escore 2, células com pleomorfismo médio, nucléolo proeminente, margem nuclear irregular e cromatina com aspecto granular. C - Robinson's Escore 3, células com pleomorfismo alto, o nucléolo notável, o núcleo com margem irregular e a cromatina com aspecto vesicular. Coloração Giemsa. Objetiva 40X..
- Figura 2 - Curvas de sobrevida de cadelas atendidas no Hospital Veterinário 27
da UFU no período de 2020 a 2022 portadoras de carcinoma mamário de acordo com o grau de dissociação celular na avaliação citológica de esfregaços de amostras colhidas por PAAF. As cadelas com tumores com grau de dissociação 1 e 2 atingem a média de sobrevida e análise de Log Rank não indicou diferença nas curvas de sobrevida de acordo com o escore de dissociação ($p=0,417$),
Uberlândia, 2024.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Diagnósticos histopatológicos e o grau histológico dos carcinomas mamários de cadelas, Uberlândia, 2024.	23
Tabela 2 -	Dados epidemiológicos de 75 cadelas com tumor de mama atendidas no Hospital Veterinário da UFU no período de 2020 a 2022, Uberlândia, 2024.	24
Tabela 3 -	Diagnóstico citológico e citomorfometria de 96 amostras de carcinomas mamários de cadelas, Uberlândia, 2024.	26
Tabela 4 –	Parâmetros citomorfométricos nucleares em carcinomas mamários de cadelas de grau 1 e tumores de grau 2/grau 3 de acordo com a classificação citológica de Robinson.	28
Tabela 5 -	Comparação de parâmetros citomorfométricos nucleares entre tumores de grau 1 e tumores de grau 2/grau 3 por histopatologia, bem como entre três graus diferentes com base em histopatologia e citologia, respectivamente	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TMC	Tumores Mamários Caninos
PAAF	Punção Aspirativa por Agulha Fina
CMH	Câncer de Mama Humano
OSH	Ovariosalpingohisterectomia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Tumor Mamário em Cadelas.....	14
2.2 Epidemiologia	14
2.3 Diagnóstico	15
2.4 Graduação	16
2.5 Prognóstico	17
3 METODOLOGIA.....	19
3.1 Análise estatística.....	21
4 RESULTADOS	22
5 DISCUSSÃO	29
6 CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS.....	32

1 INTRODUÇÃO

Os tumores mamários caninos (TMC) são frequentes nas cadelas com incidência anual estimada em 198/100.000 cadelas, sendo três vezes maior que na espécie humana (Misdorp, 2002). Em cadelas não castradas é o tipo de neoplasia mais frequente e sua propensão ao desenvolvimento de metástases representa um alto risco de mortalidade (De Nardi; Ferreira; Assunção, 2016).

Embora o exame histopatológico seja considerado o teste ouro no diagnóstico de TMC, o exame citológico oferece várias vantagens por ser simples, econômico, fácil de usar, relativamente não invasivo e rápido em fornecer o diagnóstico (Corrêa *et al.*, 2018).

Na Medicina Veterinária, a utilização da citologia como método diagnóstico vem crescendo nos últimos 20 anos. Desde 1995, o uso punção aspirativa com agulha fina (PAAF) foi aprimorado no diagnóstico de tumores de glândula mamária de cadelas, uma vez que este método pode auxiliar na escolha do melhor tratamento. Mesmo naqueles casos em que o diagnóstico não é definitivo, a PAAF pode guiar a conduta clínica e auxiliar no gerenciamento do tratamento cirúrgico (Cassali *et al.*, 2007).

A cedula é um modelo de estudos para o câncer de mama humano (CMH), devido à similaridade do comportamento biológico e molecular dos TMC e o CMH (Abdelmegeed *et al.*, 2018). Essa semelhança possibilitou a adequação da graduação histológica do CMH para os tumores mamários caninos (Elston *et al.*, 1991; Cassali *et al.*, 2013), o que levou a uma melhora no diagnóstico dos TMC e na determinação do prognóstico do paciente.

Em comparação com a grande quantidade de estudos sobre precisão diagnóstica e prognóstica do exame citológico no câncer de mama humano, há ainda, relativamente, poucos dados disponíveis sobre TMC (Dolka *et al.*, 2018).

Em humanos, a graduação citológica tem um protocolo padrão, conhecido como sistema de graduação de Robinson, que está altamente correlacionado com a classificação histológica estabelecida por Scarff Bloom-Richardson (Kuppusamy *et al.*, 2019). A PAAF é comumente aplicada para diferenciação citológica de TMC e análise de suas diferentes origens celulares (Yildirim; Gurel, 2012) mas o uso de PAAF para graduação citológica ainda não está claro, necessitando de estudos (Kuppusamy *et al.*, 2019). Há apenas um relato demonstrando a adaptação do sistema de graduação citológica de Robinson, utilizado em câncer de mama em mulheres, em cães (Dolka *et al.*, 2018) e uma revisão (Kuppusamy *et al.*, 2019) em que um sistema de graduação citológica em cães foi proposto com base na literatura.

A dissociação celular é uma importante característica citológica observada no CMH, quando combinada com outros critérios citológicos malignos, é útil no diagnóstico e é um

indicador prognóstico independente para recorrência e metástase regional na mulher (Schiller *et al.*, 2001). No entanto, o papel da dissociação celular como indicador prognóstico em TMC ainda não foi estudado.

O tamanho nuclear também é uma importante característica citológica utilizada tanto na determinação da malignidade do tumor quanto na determinação do grau citológico. No entanto, apesar da análise citológica de amostras obtidas por PAAF ser a principal ferramenta para diagnóstico em massas mamárias devido à sua facilidade e rapidez, esta é, até o momento, amplamente subjetiva (Kalhan *et al.*, 2010). Em humanos, a sobreposição morfológica entre as lesões pré-cancerosas e o carcinoma propriamente dito gera ainda uma “zona cinzenta” na citologia, estimada em 8,9% (Al-Kaisi, 1994).

O uso de técnicas complementares, como morfometria, imuno-histoquímica e citometria de fluxo, é importante para oferecer um diagnóstico preciso e reproduzível, principalmente em casos de lesões borderline e malignas (Arora *et al.*, 2007). A morfometria é a medição de vários parâmetros celulares microscopicamente/por citometria de fluxo/análise de imagem e o seu potencial na citologia ainda não foi totalmente explorado.

Assim, o presente estudo teve como objetivos avaliar por meio de exame citológico a dissociação celular e os parâmetros morfométricos área, perímetro e diâmetro do núcleo das células tumorais em amostras de tumores mamários de cadelas atendidas no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Objetivou-se também determinar se estes parâmetros podem ser utilizados como fatores de prognóstico para TMC.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tumor Mamário em Cadelas

Os tumores mamários caninos (TMC) são muito comuns na rotina da clínica e cirurgia veterinária, principalmente em cadelas inteiros (Dolka *et al.*, 2018). Dentre os diversos tumores mamários, 50 a 70% deles são tumores malignos (Kupussami *et al.*, 2019), o que pode estar relacionado com o diagnóstico tardio. Os tecidos tumorais podem se diferenciar em outros tipos de tecidos, sendo elas metaplasias óssea, cartilaginosa e escamosa (Yildirim *et al.*, 2012).

Na espécie canina, geralmente, ocorre o desenvolvimento de cinco pares de glândulas mamárias e durante o ciclo estral das cadelas, as glândulas mamárias passam por uma fase de proliferação e por conseguinte uma regressão (Silver *et al.*, 1966). Desse modo, a taxa de incidência do TMC em uma cadelas que passa por ovariosalpingohisterectomia (OSH) antes do primeiro cio é de 0,5% (Schneider *et al.*, 1969).

Dentre os diversos tipos de TMC, os carcinomas complexos são o tipo mais frequente, seguido pelos carcinomas simples, sólidos, mistos, anaplásicos e fibrossarcomas (Kupussami *et al.*, 2019). Quando os TMC ocorrem nas glândulas mamárias inguinais (M5) há a possibilidade de metástases retrógradas, por meio da drenagem linfática no tecido subcutâneo (Sorenmo *et al.*, 2011).

Devido a semelhança das neoplasias mamárias em mulheres e cadelas, há a possibilidade de utilizar os critérios citológicos, estabelecidos na medicina humana, para o diagnóstico dos TMC (Cassali *et al.*, 2007). Entretanto, o sistema de graduação citológica em cadelas não foi bem estabelecido, sendo apenas um estudo até o presente momento (Dolka *et al.*, 2018).

2.2 Epidemiologia

Apesar das neoplasias mamárias em cadelas terem incidência global, há estudos que relatam a diminuição da sua ocorrência nos Estados Unidos, devido a prática da OSH em animais jovens (Yildirim *et al.*, 2012). Cadelas inteiros ou que passaram pela OSH após o segundo estro tem maior incidência devido a exposição aos hormônios ovarianos endógenos (Sorenmo *et al.*, 2011).

Além do fator hormonal, há diversos fatores que predispõe ao aparecimento do TMC (Sorenmo *et al.*, 2011), sendo dois desses a idade e a raça. Cadelas mais velhas, com 8 anos ou mais, são as mais acometidas e com maior chance de desenvolverem a forma maligna (Goldschmidt *et al.*, 2001). Já o aparecimento em cadelas com menos de 5 anos é raro e com maior probabilidade de ser um tumor benigno (Schneider *et al.*, 1970).

Diversas raças podem ser acometidas pelas neoplasias mamárias, sendo algumas mais predispostas Poodle, Pastor Alemão, Chihuahua, Beagle, Cooker Spaniel, Mâltos, Yorkshire e Dachshund (Sorenmo *et al.*, 2011). No entanto, a população de cães sem raça definida (SRD) apresentam uma alta incidência no Brasil (Ribas *et al.*, 2012) em relação as raças puras.

2.3 Diagnóstico

O diagnóstico dos TMC é realizado a partir de um exame clínico minucioso, histórico reprodutivo da cadela (castração, terapia hormonal, pseudociese), idade e avaliação da presença de nódulos mamários e avaliação dos linfonodos regionais (Cassali *et al.*, 2007; Cassali *et al.*, 2011). Se houver metástase, o animal pode apresentar mais sinais clínicos como dispneia, tosse e dificuldade na deambulação (Johnston *et al.*, 2003).

No exame físico, as glândulas mamárias devem ser palpadas individualmente e os nódulos mamários devem ser avaliados a partir do tamanho, formato, consistência, se está aderido ao subcutâneo ou a musculatura, se há ulceração (Burke *et al.*, 2012).

Após essa avaliação, o exame citopatológico faz-se necessário para uma melhor conduta terapêutica, além de auxiliar na suspeita se é um tumor maligno ou benigno (Cassali *et al.*, 2011). As lesões hiperplásicas e displásicas irão apresentar uma proliferação do epitélio secretor ou ductal das células mioepiteliais, entretanto, essas características citológicas se assemelham a neoplasias benignas, o que dificulta o diagnóstico (Solano-Gallego *et al.*, 2012).

Somado a isso, considerando a drenagem linfática das glândulas mamárias, os linfonodos regionais devem ser avaliados quanto a sua mobilidade, consistência, temperatura e tamanho (Sorenmo *et al.*, 2011). Em seguida, faz-se a aspiração dos linfonodos para avaliar quanto a possibilidade de metástases (Solano-Gallego *et al.*, 2012). Logo, exames complementares de imagem são necessários, dada a suspeita de metástases pelas neoplasias malignas, sendo a radiografia torácica para procura de metástase pulmonar (Cassali *et al.*, 2011) e o exame ultrassonográfico para avaliar se há metástases em órgãos da cavidade abdominal (Ribas *et al.*, 2012).

Para a diferenciação dos TMC em benignos ou malignos na histologia, é avaliado o arranjo, a invasão neoplásica, o pleomorfismo celular e se há presença ou ausência de componentes mesenquimais não neoplásicos (Sorenmo *et al.*, 2011). Os sistemas Misdorp *et al.* (1999) e Gilbertson *et al.* (1983) são os mais utilizados para classificação de neoplasias mamárias.

Segundo Misdorp *et al.* (1999), os TMC podem ser classificados como lesões não neoplásicas (hiperplasia epitelial - ductal e lobular), tumores benignos (adenoma simples e

complexo, fibroadenoma, tumor benigno misto, papiloma ductal) e tumores malignos, sendo alguns mais frequentes carcinoma *in situ*, carcinoma simples (tubular, cístico-papilar e cribiforme), carcinoma complexo, micropapilar, sólido, comedocarcinoma, anaplásico, em tumor misto, mioepitelioma maligno, ductal e intraductal. Somado a esses há neoplasias mamárias com diferenciação sarcomatosa, como o fibrossarcoma, osteossarcoma, hemangiossarcoma.

Dado o exame histopatológico como padrão ouro para diagnóstico do TMC (Dolka *et al.*, 2018), é importante fazer a análise de cada glândula mamária, mesmo que na avaliação macroscópica não apresente alterações, e na cadeia é comum os nódulos terem histogêneses distintas (Sorenmo *et al.*, 2011). Como complemento da histologia, há a possibilidade de realizar a imuno-histoquímica para determinar a origem da neoplasia, como também para fator prognóstico (Cassali *et al.*, 2011).

2.4 Graduação

O primeiro método de graduação histológica descrito foi o Sistema de Nottingham, modificado por Elston e Ellis (1991), fundamentado na formação tubular, pleomorfismo nuclear e no índice mitótico. A partir dessa graduação histológica, Peña *et al.* (2013) propôs uma adaptação, considerando a formação tubular (1 ponto: mais de 75% do tumor é formado por túbulos, 2 pontos: entre 10% e 75% de formação tubular (formação moderada de arranjos tubulares misturado com áreas de crescimento sólido), 3 pontos: 10% ou menos de formação tubular do tumor (formação mínima ou nenhuma formação de túbulos), o pleomorfismo nuclear (1 ponto: núcleo pequeno, uniforme ou regular e nucléolo ocasional); 2 pontos: grau moderado de variação no tamanho e forma nuclear, núcleo hiperclorâmico, presença de nucléolos (alguns dos quais podem ser proeminentes); 3 pontos: variação acentuada no tamanho nuclear, núcleo hiperclorâmico, muitas vezes com 1 ou mais nucléolos proeminentes; e a quantidade de mitoses em objetiva de 40x em 10 campos (1 ponto: 0-9 mitoses, 2 pontos: 10-19 mitoses, 3 pontos: acima de 20 mitoses). Desse modo, a somatória de pontos indica o grau, sendo grau I de 3 a 5 pontos, grau II 6 a 7 pontos e grau III 8 a 9 pontos.

A citologia por punção aspirativa por agulha fina (PAAF) é um método muito utilizado na medicina veterinária, porém a graduação citológica para o TMC não foi bem estabelecida como na medicina humana (Robinson *et al.*, 1994).

Dolka *et al.* (2018) analisaram a aplicação do sistema de graduação de Robinson modificado para graduação citológica do câncer de mama canino. Estes autores avaliaram

características como dissociação celular, debris celulares, matriz extracelular e citomorfometria para a classificação das neoplasias em benignas ou malignas.

A graduação citológica proposta por Dolka *et al.* (2018), fundamentada no sistema de Robinson, avalia seis características atribuindo escore a cada uma delas: dissociação celular (1 ponto: maior quantidade de células agrupadas, 2 pontos: células separadas e agrupadas, 3 pontos: maior quantidade de células separadas); tamanho da célula (1 ponto: 1-2x o tamanho de hemácia, 2 pontos: 3-4x o tamanho de hemácia, 3 pontos: >5x o tamanho de hemácia); uniformidade celular (1 ponto: monomórfico, 2 pontos: pouco pleomórfico, 3 pontos: pleomórfico); nucléolo (1 ponto: indistinto, 2 pontos: notável, 3 pontos: proeminente ou pleomórfico); margem nuclear (1 ponto: suave, 2 pontos: dobras, 3 pontos: botões/fendas); cromatina (1 ponto: vesicular, 2 pontos: granular, 3 pontos: aglomerada e limpa). Dessa forma, se a soma dos escores for entre 6 a 11 pontos o tumor receberá Grau 1, entre 12 a 14 pontos será Grau 2 e de 15 a 18 pontos Grau 3.

2.5 Prognóstico

Os fatores prognósticos irão indicar a evolução clínica e o tempo de sobrevida do animal após o procedimento cirúrgico, sendo características apresentadas pelo indivíduo e do tumor (Benavente *et al.*, 2016).

De acordo com Sorenmo *et al.* (2011), o tamanho do tumor, se há metástase em linfonodos e o estádio do animal são fatores prognósticos relevantes. Considerando o fator tamanho do tumor, são 3 categorias de estadiamento, sendo a T1: menor que 3cm, T2: 3 a 5cm e T3: maior que 5cm. Para o estado do linfonodo é utilizado N0 quando não há presença de metástase e N1 com presença de metástase. O estadiamento tumoral varia de I a V, sendo considerado os estádios III, IV e V com piores taxas de sobrevida (Yamagami *et al.*, 1996).

As cadelas com tumores maiores que 5cm apresentam uma sobrevida menor a cães com tumores menores (Chang *et al.*, 2005) e um risco maior de recidiva (Kurtzman *et al.*, 1986). Ademais, cadelas que apresentam metástases distantes estão associadas a prognósticos desfavoráveis (Cassali *et al.*, 2011).

São relatados outros fatores que podem influenciar no desenvolvimento de TMC, sendo o uso incorreto de progestágenos e a pseudociese, devido a exposição a altos níveis de progesterona e estrógeno no ciclo estral das cadelas (Sorenmo *et al.*, 2013). Somado a esses, Mazzaferro *et al.* (2013) apresenta que cadelas com sobre peso são mais propensas a terem neoplasias mamárias, e alguns mecanismos são estudados para essa ocorrência, como os

mediadores inflamatórios e estrógeno produzidos pelos adipócitos (SIMPSON e BRONW, 2013).

3 METODOLOGIA

Foram utilizados prontuários de cadelas com tumores mamários (TM) atendidas no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia, por meio de estudo retrospectivo, no período de janeiro de 2020 a dezembro de 2022.

Os critérios de inclusão de cadelas no estudo foram: cadelas com TM submetidas a exames de imagem, com diagnóstico de tumor de mama por exame citológico, que tenham sido submetidas a mastectomia e com diagnóstico histopatológico.

Dados clínicos foram coletados dos prontuários, tais como: idade ao diagnóstico, status de castração, raça, tamanho e localização tumor, presença de ulceração, estadio clínico.

No acervo do Laboratório de Patologia Animal foram selecionadas as lâminas citológicas e histológicas que foram utilizadas para o diagnóstico dos TM destes pacientes. As lâminas histológicas foram revisadas e o diagnóstico e o grau confirmados por dois patologistas, após verificação de lesões em lâminas coradas em hematoxilina e eosina (HE). A classificação histológica das neoplasias foi determinada conforme Goldschmidt *et al.* (2011). Para a atribuição do grau histológico de malignidade, três parâmetros serão avaliados: a porcentagem do tumor com organização tubular, o pleomorfismo nuclear e o índice mitótico, de acordo com o sistema de Elston e Ellis (1998) adaptado por Peña *et al.* (2012).

Na análise das lâminas de citologia foram utilizadas amostras de TMC coradas com Giemsa. Os esfregaços para o exame foram selecionados com base na sua alta qualidade (espessura do esfregaço, morfologia das células, coloração adequada) de acordo com Sapierzyński; Czopowicz; Ostrzeszewicz (2017).

O diagnóstico citológico do comportamento tumoral foi atribuído por meio das características citológicas de malignidade: hipercelularidade, tamanho e forma celular variável (pleomorfismo; anisocitose, macrócitose), tamanho e forma nuclear variável (anisocariose, macrocariose), aumento da proporção nuclear-citoplasmática; nucléolos grandes, proeminentes ou múltiplos, formato do núcleo, grau de aglomeração da cromatina; presença de células multinucleadas anormais e figuras mitóticas, segundo Meinkoth, Cowell, Tyler (2007) e Yildirim, Gurel (2012). Detalhes celulares e nucleares foram avaliados em campos de grande aumento (objetiva 40X). Baseado nestas características as amostras foram classificadas em dois grupos: carcinoma simples e carcinoma misto (carcinoma complexo, carcinoma em tumor misto).

Amostras foram classificadas como carcinoma simples quando apresentaram celularidade moderada/alta; com células epiteliais (únicas e agrupadas) sendo predominantes e apresentando critérios citológicos de malignidade. Já as características citológicas de carcinoma

complexo e carcinoma em tumor misto são bastante semelhantes, contendo muitas células epiteliais ocorrendo isoladamente ou em grupos, com características citológicas de malignidade e quantidade moderada a acentuada de células mioepiteliais e fibras colágenas misturadas a matriz extracelular rósea. Quando a matriz extracelular e o fundo eosinofílico eram mais abundantes e/ou fossem observados osteoclastos, a amostra foi diagnosticada como carcinoma em tumor misto. Os diagnósticos citológicos foram comparados com o diagnóstico histopatológico padrão-ouro.

Amostras de tumores mamários interpretadas citologicamente como malignas foram então avaliadas para atribuição de grau citológico, utilizando a classificação citológica de Robinson aplicada em tumores mamários de mulheres (Robinson *et al.*, 1994). Seis diferentes características citológicas foram avaliadas (Quadro 1): dissociação celular, tamanho nuclear, uniformidade celular, nucléolos, margem nuclear, padrão de cromatina. A pontuação de 1 a 3 foi atribuída a cada uma destas características e o grau do carcinoma mamário foi classificado somando as pontuações para obter uma escore total para cada caso. foram considerados grau 1 carcinomas mamários com escore 6-11; grau 2 escore 12-14 e grau 3 escore 15-18. O grau citológico foi comparado com o grau histopatológico (padrão-ouro).

Quadro 1 - Sistema de graduação citológica de Robinson para câncer de mama humano.

CITOMORFOLOGIA	ESCORE		
	1 Ponto	2 Pontos	3 Pontos
Dissociação	Maior quantidade de células agrupadas	Misto de células separadas e agrupadas	Maior quantidade de células separadas
Tamanho da Célula	1-2X o tamanho de uma hemácia	3-4 X o tamanho de uma hemácia	> 5X o tamanho de uma hemácia
Uniformidade Celular	Monomórfico	Pouco pleomórfico	Pleomórfico
Nucléolo	Indistinto	Notável	Proeminente
Margem Nuclear	Suave	Dobras	Botões/fendas
Cromatina	Vesicular	Granular	Aglomerado e Limpo

Grau 1 = 6-11 pontos; Grau 2 = 12-14 pontos; Grau 3 = 15-18 pontos.

Fonte: Robinson *et al.* (1994).

Na citomorfometria foram capturadas imagens utilizando microscópio Eclipse Ci-L

(Nikon®) na objetiva de 40x, com adaptador cilíndrico para padronizar a distância da câmera do celular até a objetiva. Foi utilizado o software ImageJ para a morfometria e para a calibração utilizamos lâmina micrométrica no microscópio, em que os espaços correspondiam a 0,01mm, e no programa padronizamos a escala de acordo com a contagem de pixels dessa lâmina, obteve-se que a distância de 5 pixels era igual a 1 μm .

Regiões de alta densidade de células neoplásicas foram examinadas em grande aumento (objetiva de 40X) e selecionadas campos que tiveram suas imagens capturadas. Cinquenta núcleos de células epiteliais foram avaliados com a ferramenta “Multi-point” evitando a análise repetida de um mesmo núcleo. As características nucleares (área nuclear média, perímetro nuclear médio, diâmetro nuclear médio) foram determinadas com as ferramentas “Freehand” e “Oval” para fazer a seleção da circunferência do núcleo celular e depois a opção “Measure” retornava o resultado da área e o perímetro do respectivo núcleo selecionado. Já para a análise do diâmetro, foi utilizada a ferramenta “Straight”, que trazava uma linha reta, e em seguida a opção “Measure” retornava a medida do diâmetro selecionado. Os resultados foram tabulados e calculada a média de cada parâmetro.

Quanto às amostras avaliadas, naquelas cadelas que possuíam mais de um tumor de mama, foram selecionadas três amostras de três cadelas e duas amostras de 15 cadelas, totalizando 96 amostras, considerando os tipos histológicos considerados mais agressivos de acordo com Rasotto *et al.* (2017) para avaliação dos parâmetros citomorfométricos.

3.1 Análise estatística

As variáveis numéricas foram apresentadas como média aritmética e desvio padrão (DP) e comparadas entre dois grupos com o teste U de Mann-Whitney e com o teste de Kruskal-Wallis entre mais de dois grupos.

Depois da cirurgia, o acompanhamento dos cães foi de pelo menos 18 meses. Foi feita a censura na curva de sobrevida daqueles que morreram por qualquer causa, ou ainda estavam vivos ao final do período de observação.

O gráfico de Kaplan-Meier e o teste de log rank de Mantel-Cox foram usados para comparar a Sobrevida Global entre cães com tumores com grau de dissociação 1, 2 e 3 na análise citológica de esfregaços de amostras de carcinoma mamário colhidas por PAAF.

O nível de significância (α) utilizado foi de 0,05 em todos os testes estatísticos e as análises estatísticas foram realizadas no software SPSS.

4 RESULTADOS

Foram selecionadas 75 cadelas com diagnóstico de tumores mamários, sendo 84% idosas ao diagnóstico (7 anos ou mais de idade) e 65,33% não eram castradas. Além disso, 50,67% das cadelas eram sem raça definidas (SRD) e a raça mais frequente foi a Poodle (16,00%) seguido da raça Pinscher (5,33%). Em relação ao tamanho do tumor 64% eram T1 e 30,67% eram localizados na mama inguinal M5. Quanto a presença de ulceração, 78,67% dos tumores não eram ulcerados e 58,67% das cadelas eram estadio I (Tabela 2).

Na avaliação histopatológica, o tipo histológico carcinoma em tumor misto foi o mais frequente (38,54%), seguido de carcinoma complexo (14,59%). Quanto ao grau, a maioria das amostras era de grau 1 (55,21% (Tabela 1).

Tabela 1 - Diagnósticos histopatológicos e o grau histológico dos carcinomas mamários de cadelas atendidas no Hospital Veterinário da UFU no período de 2020 a 2022, Uberlândia, 2024.

Diagnósticos Histológicos	Número de Amostras (%)
Carcinoma em Tumor Misto	37 (38,54)
Carcinoma Tubulopapilar	19 (19,80)
Carcinoma Complexo	14 (14,59)
Carcinoma Tubular	12(12,50)
Carcinoma Sólido	4 (4,17)
Carcinoma Adenoescamoso	2 (2,08)
Adenomioepelioma	1 (1,04)
Maligno	
Carcinossarcoma	1 (1,04)
Comedocarcinoma	1 (1,04)
Carcinoma Papilar	1 (1,04)
Carcinoma Anaplásico	1 (1,04)
Carcinoma Mucinoso	1 (1,04)
Carcinoma Micropapilar	1 (1,04)
Invasor	
Carcinoma de Células Fusiformes	1(1,04)
Grau Histológico	Número de Amostras (%)
1	53 (55,21)
2	38 (39,59)
3	5 (5,20)
Total	96 (100)

Fonte: a autora.

Tabela 2 - Dados epidemiológicos de 75 cadelas com tumor de mama atendidas no Hospital Veterinário da UFU no período de 2020 a 2022, Uberlândia, 2024.

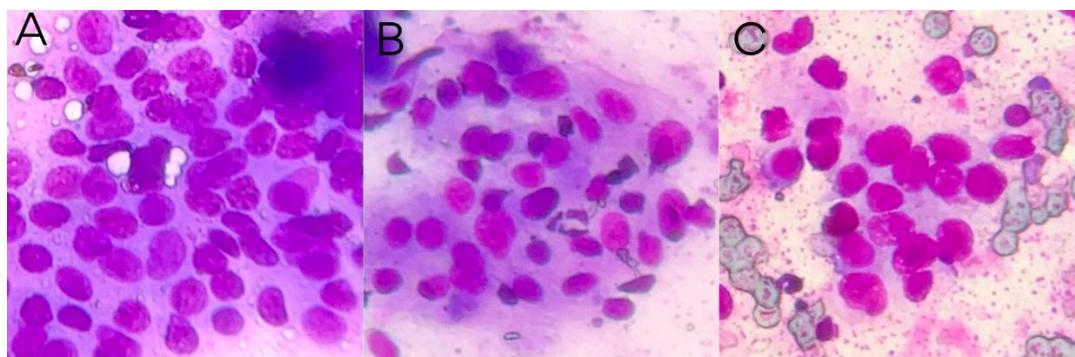
Faixa etária	Número de Cadelas (%)
Adulto	12 (16,00)
Idoso	63 (84,00)
Estado reprodutivo	Número de Cadelas (%)
Castrada	23 (30,67)
Inteira	49 (65,33)
NI	3 (4,00)
Raças	Número de Cadelas (%)
SRD	38 (50,67)
Poodle	13 (16,00)
Pinscher	4 (5,33)
Shih-Tzu	4 (5,33)
Bassethound	3 (4,00)
Yorkshire Terrier	3 (4,00)
Fox Terrier Brasileiro	1 (1,33)
Border Collie	1 (1,33)
Chow Chow	1 (1,33)
Labrador	1 (1,33)
Schnauzer	1 (1,33)
Fila Brasileiro	1 (1,33)
Rottweiler	1 (1,33)
Boxer	1 (1,33)
Maltês	1 (1,33)
Lhasa Apso	1 (1,33)
Pitbull	1 (1,33)
Tamanho do Tumor	Número de Cadelas (%)
T1(T < 3cm)	48 (64,00)
T2 (3 < T < 5cm)	10 (13,33)
T3 (T > 5cm)	17 (22,67)
Localização do Tumor	Número de Cadelas (%)
M1 (mama torácica cranial)	1 (1,33)
M1 e M2	2 (2,67)
M2 (mama torácica caudal)	12 (16,00)
M2 e M3	2 (2,67)
M3 (mama abdominal cranial)	12 (16,00)
M4 (mama abdominal caudal)	22 (29,33)
M4 e M5	1 (1,33)
M5 (mama inguinal)	23 (30,67)
Presença de Ulceração	Número de Cadelas (%)
Sim	16 (21,33)
Não	59 (78,67)
Estadiamento	Número de Cadelas (%)
1	44 (58,67)
2	8 (10,67)
3	8 (10,67)
4	8 (10,67)
5	7 (9,33)
Total	75 (100)

Fonte: a autora.

A maioria das amostras foram diagnosticadas como carcinoma simples na avaliação citiológica (78,12%) e de grau 1 (55,21%) (Tabela 3).

Na avaliação da dissociação celular, das 96 amostras de tumores malignos estudadas, 51 (53,12 %) apresentaram escore de dissociação 1; 35 (36,46 %) escore 2 e 10 (10,42 %) escore 3.

Figura 1 – Adaptação do Sistema de Graduação de Robinson's em cadelas. A - Robinson's Escore 1, células com pleomorfismo médio, o nucléolo indistinto, o núcleo com margem irregular e cromatina com aspecto granular. B - Robinson's Escore 2, células com pleomorfismo médio, nucléolo proeminente, margem nuclear irregular e cromatina com aspecto granular. C - Robinson's Escore 3, células com pleomorfismo alto, o nucléolo notável, o núcleo com margem irregular e a cromatina com aspecto vesicular. Coloração Giemsa. Objetiva 40X.



Fonte: a autora.

Teste de Kruskall-Wallis demostrou que há diferença na distribuição dos escores de dissociação entre os graus 1 e 3 na citologia ($p = 0,024$), indicando que no grau citológico 1 as células apresentam-se agrupadas. Entretanto, quando comparadas as distribuições dos escores de dissociação entre os graus 1 e 3 na histologia ($p = 0,564$) não houve diferença significativa. Foi realizada a comparação entre os escores de dissociação e presença de metástase em linfonodo e estadio e o Teste de Kruskall-Wallis demostrou que não há diferença na distribuição dos escores de dissociação entre tumores com metástase em linfonodo ($p>0,05$) e entre escores de dissociação e estádios ($p>0,05$).

Tabela 3 - Diagnóstico citológico e citomorfometria de 96 amostras de carcinomas mamários de cadelas atendidas no Hospital Veterinário da UFU no período de 2020 a 2022, Uberlândia, 2024.

Diagnóstico citológico	Número de amostras (%)
Carcinoma em Tumor Misto	6 (6,25)
Carcinoma Complexo	15 (15,63)
Carcinoma Simples	75 (78,12)
Grau citológico	
1	53 (55,21)
2	38 (39,58)
3	5 (5,21)
Parâmetros Nucleares	\bar{x} (μm)
Área nuclear	82,615
Perímetro nuclear	32,966
Diâmetro nuclear	10,854
Escore de Dissociação*	
1	51 (53,12)
2	35 (36,46)
3	10 (10,42)

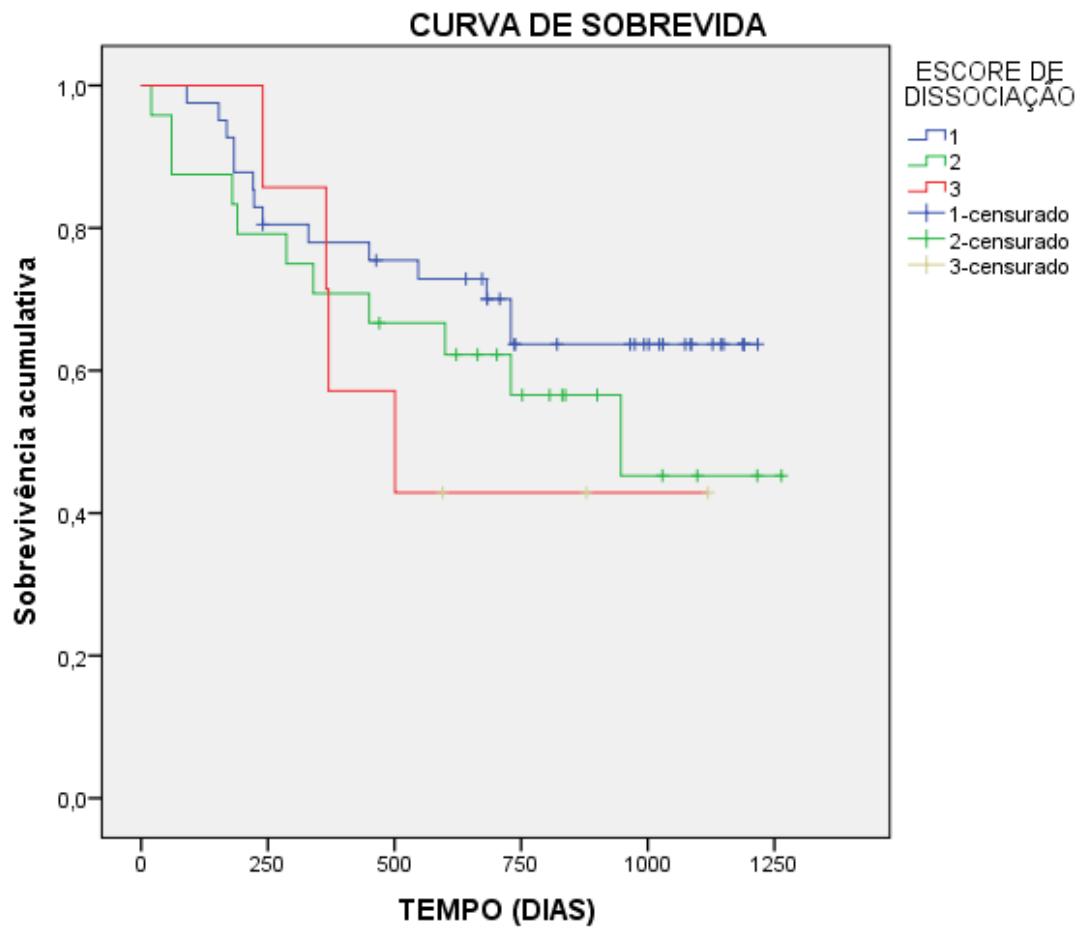
*1 - Maioria das células agrupadas; 2 – Misto, com células agrupadas ou separadas; 3 - Maioria das células separadas.

Fonte: a autora.

Dados de dissociação também foram avaliados de acordo com a sobrevida das cadelas portadoras de carcinoma mamário. Foi possível acompanhar 72 cadelas por período mínimo de 18 meses.

A média de sobrevida global das cadelas com carcinoma mamário foi de 881 dias. Apesar da análise de Log Rank não ter indicado diferença nas curvas de sobrevida de acordo com o escore de dissociação ($p=0,417$), cães com tumores com grau de dissociação 2 e 3 alcançaram a mediana de sobrevida global. A sobrevida média foi de 910, 813 e 690 dias para os graus de dissociação 1, 2 e 3, respectivamente (Figura 2).

Figura 2 - Curvas de sobrevida de cadelas atendidas no Hospital Veterinário da UFU no período de 2020 a 2022 portadoras de carcinoma mamário de acordo com o grau de dissociação celular na avaliação citológica de esfregaços de amostras colhidas por PAAF. As cadelas com tumores com grau de dissociação 1 e 2 atingem a média de sobrevida e análise de Log Rank não indicou diferença nas curvas de sobrevida de acordo com o escore de dissociação ($p=0,417$), Uberlândia, 2024.



Fonte: a autora;

Realizou-se a comparação entre os dados citomorfométricos nucleares e grau citológico de Robinson para se avaliar se a morfometria do núcleo era um importante fator associado ao grau citológico. Entretanto, não houve diferença de área ($p=0,691$), perímetro ($p=0,652$) e diâmetro ($p=0,881$) nuclear entre grau citológico 1 e grau citológico 2/3 (Tabela 4).

Tabela 4 - Parâmetros citomorfométricos nucleares em carcinomas mamários de cadelas de grau 1 e tumores de grau 2/grau 3 de acordo com a classificação citológica de Robinson.

PARÂMETRO CITOMORFOMÉTRICOS	CITOPATOLOGIA		VALOR DE p ^a
	NUCLEARES	(Média, Desvio Padrão)	
	Grau 1 (N= 62)	Grau 2 /Grau 3 (N= 35)	
Área (μm)	82,47 (19,96)	84,29 (19,16)	0,691
Perímetro (μm)	32,91 (3,66)	33,16 (3,75)	0,652
Diâmetro (μm)	10,83 (1,46)	10,91 (1,26)	0,881

a – Teste U de Mann-Whitney

Fonte: a autora.

Da mesma forma, na comparação entre os dados citomorfométricos nucleares e grau histológico, não houve diferença de área ($p=0,954$), perímetro ($p=0,700$) e diâmetro ($p=0,611$) nuclear entre grau histológico 1 e grau histológico 2/3, assim como não houve diferença de área ($p=0,931$), perímetro ($p=0,789$) e diâmetro ($p=0,395$) nuclear entre grau histológico 1, 2 e 3. Também não houve diferença de área ($p=0,904$), perímetro ($p=0,713$) e diâmetro ($p=0,983$) nuclear entre grau citológico 1, 2 e 3 (Tabela 5).

Tabela 5 - Comparação de parâmetros citomorfométricos nucleares entre tumores de grau 1 e tumores de grau 2/grau 3 por histopatologia, bem como entre três graus diferentes com base em histopatologia e citologia, respectivamente.

PARÂMETRO	HISTOPATOLOGIA		CITOPATOLOGIA
	Grau 1 vs Grau2/3	Grau 1, 2 e 3	Grau 1, 2 e 3
	Valor de p ^a	Valor de p ^b	Valor de p ^b
Área (μm)	0,954	0,931	0,904
Perímetro (μm)	0,700	0,789	0,713
Diâmetro (μm)	0,611	0,395	0,983

a – teste U de Mann-Whitney, b – teste de Kruskal-Wallis.

Fonte: a autora.

5 DISCUSSÃO

Na avaliação da dissociação celular, das 96 amostras de tumores malignos estudadas, 51 (53,12 %) apresentaram escore de dissociação 1; 35 (36,46 %) escore 2 e 10 (10,42 %) escore 3. A partir desses resultados, os carcinomas apresentaram com maior frequência escore de dissociação 1, entretanto, os dados de Dolka *et al.* (2018) mostram que o escore de dissociação 2 e 3 foram mais frequentes no total de 55 cadelas, sendo ambos com resultado de 20 (36,4%) e 15 (27,2%) escore 1.

Os resultados indicaram diferença da distribuição dos escores entre o grau citológico 1 e 3, sendo que no grau citológico 1 o escore de dissociação mais frequente foi o 1, onde as células estavam mais agrupadas. Robinson *et al.* (1994) também apontaram que a dissociação celular e a aparência de nucléolos foram as características mais influentes na determinação do grau citológico. O mesmo não foi observado com relação ao grau histológico, o que pode estar relacionado ao fato de que a graduação histológica não avalia a dissociação celular como característica de malignidade.

A importância da dissociação celular como característica de malignidade também foi avaliada de acordo com as variáveis metástase em linfonodo e estadio.

Dados sobre a ocorrência de metástases estavam disponíveis para 75 cães. Doze (16%) cães desenvolveram metástases para os linfonodos regionais. Metástases estavam presentes em 25% (3/12) dos tumores de grau 3, 41,67% (5/12) de grau 2 e 33,33% (4/12) de grau 1 de acordo com o sistema de Robinson.

Assim como no estudo de Shiller *et al.* (2001), que verificaram que a dissociação celular não teve correlação com o desenvolvimento de metástases em linfonodos regionais, os resultados da presente pesquisa também não indicaram esta relação. Por outro lado, Dolka *et al.* (2018) demonstraram associação entre grau citológico com metástase em linfonodo e à distância.

Na análise da curva de sobrevida, apesar de não ter sido demonstrada diferença na sobrevida de acordo com o escore de dissociação, os tumores de escore 2 e 3 atingiram a média de sobrevida. A mediana da sobrevida indica o tempo em que 50% dos indivíduos que receberam um determinado tratamento atingem o evento de interesse, que no caso é o óbito (Miot, 2017). Dolka *et al.* (2018) verificaram que houve uma diferença na sobrevida de cães de acordo com o grau citológico, com os cães com tumores grau 2 e 3 tendo sobrevida menor. No

presente estudo não foi observada esta diferença na sobrevida, apesar dos cães com tumores de grau 3 terem apresentado 690 dias sobrevida em comparação com os cães com tumores grau 1 que tiveram 910 dias.

Estudos elaborados por Kalhan, *et al.* (2010) demonstram que os parâmetros nucleares das células tumorais são significativos para a diferenciação de tumores benignos e malignos na citologia. No entanto, não foram evidenciadas diferenças nos parâmetros nucleares citomorfométricos (área, perímetro e diâmetro) de acordo com os diferentes graus citológicos, assim como nos graus histológicos. Dolka *et al.* (2018) também não verificaram diferenças de área, perímetro e diâmetro entre os graus histológicos e grau citológico.

A literatura afirma que a presença de inflamação e necrose associadas à ulceração podem comprometer a acurácia da citologia, levando a possíveis erros de graduação (GUPTA & PRADEEP, 2019; MEINKOTH *et al.*, 2007). Na presente pesquisa, observou-se que dos 16 tumores ulcerados, 6 apresentaram discrepância entre o escore de dissociação e o histopatológico, o que sugere que o impacto da inflamação pode ter interferido na interpretação das lâminas.

6 CONCLUSÃO

A dissociação celular é uma importante característica a ser considerada na avaliação do grau citológico de Robinson e, na presente pesquisa, o escore de dissociação 1 foi o mais frequente em tumores com grau citológico 1. Entretanto a análise citomorfométrica do núcleo possui valor limitado na determinação da malignidade dos tumores na avaliação citológica. Dessa forma, a dissociação celular isoladamente não deve ser utilizada como fator de prognóstico para TMC.

REFERÊNCIAS

- ABDELMEGEED SM, MOHAMMED S. Canine mammary tumors as a model for human disease. **Oncol Lett**, v. 15, n. 8, p. 195-205, 2018. DOI: 10.3892/ol.2018.8411
- AL-KAISI N. The spectrum of the "gray zone" in breast cytology. A review of 186 cases of atypical and suspicious cytology. **Acta Cytologica**, v. 38, n. 6, p. 898-908, 1994. PMID: 7992576.
- ANNE B. SCHILLER, TALAAT S. TADROS, GEORGE G. BIRDSONG, NORMAN A. GROSSL. Cellular Dyscohesion in Fine-Needle Aspiration of Breast Carcinoma: Prognostic Indicator for Axillary Lymph Node Metastases? **American Journal of Clinical Pathology**. Volume 115, Issue 2, Pages 219–223, 2001. <https://doi.org/10.1309/PR6K-7RXQ-NJUD-443Q>
- ARORA B, RENU, KAKADE AC, REKHI B. Diagnostic application of mean nuclear area (mna) measured by computerized interactive morphometry in breast cancer. **The Internet Journal of Pathology**. v. 5, n. 2, 2007.
- BURKE, H. B.; HUTTER, R. V. P.; HENSON, D. E. Breast carcinoma. In: PAUL HERMANEK, P.; GOSPODAROWICZ, M, K.; HENSON, D. E.; HUTTER, R. V. P.; SOBIN, L. (Eds). **Prognostic factors in cancer**. Springer Science & Business Media: New Delhi, 2012. cap.8, 290 p.
- CASSALI, G.D. *et al.* Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.4, n.2, p. 153-180, 2011.
- CASSALI, G.D. *et al.* Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 7, n. 2, p.38-69, 2013.
- CHANG SC, CHANG CC, CHANG TJ, WONG ML. 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, p. 1625–1629, 2005.
- Corrêa, J. M. X., Oliveira, N. G. S. G., Silva, F. L., Michel, A. F. R. M., Lavoer, M. S. L., Silva, E. B., & Carlos, R. S. A.. O Diagnóstico preciso muda o prognóstico do paciente felino com carcinoma de células escamosas? **Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v. 15, n. 46, p. 54-60, 2018.
- DE NARDI, A. B.; FERREIRA, T. M. M. R.; ASSUNÇÃO, K. A. Neoplasias mamárias. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B. **Oncologia em cães e gatos**. 2 ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. cap. 40, p. 726-756.
- DOLKA I, CZOPOWICZ M, GRUK-JURKA A, WOJTKOWSKA A, SAPIERZYNSKI R, JURKA P Diagnostic efficacy of smear cytology and Robinson's cytological grading of canine mammary tumors with respect to histopathology, cytomorphometry, metastases and overall survival. **PLOS ONE**. v. 13, n. 1, 2018. e0191595. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191595>

ELSTON, C.W.; ELLIS, I.O. Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**, v.19, p.403-410, 1991. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x>

GILBERTSON SR, KURZMAN ID, ZACHRAU RE, HURVITZ AI, BLACK MM: Canine mammary epithelial neoplasms: Biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. **Veterinaty Pathology**. v. 20, p. 127–142, 1983.

GOLDSCHMIDT, M.; PEÑA, L.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V. Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v.48, n. 1, p. 117-131, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1177/0300985810393258>

GOLDSCHMIDT, M.H.; PENA, L.; ZAPPULLI, V. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN, D.J. (Ed.). **Tumors in domestic animals**.5 ed., Ames, Iowa: John Wiley & Sons Inc., 2017, p. 723-765.

JOHNSTON SD. Reproductive systems. In: Textbook of Small Animal Surgery. **Slatter D** (ed.). Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2003, p. 2177–2192.

KALHAN, SHIVANI; DUBEY, SUPARNA; SHARMA, SONIA; DUDANI, SHARMILA; PREETI; DIXIT, MONIKA. Significance of nuclear morphometry in cytological aspirates of breast masses. **Journal of Cytology**. v. 27, n. 1, p. 16-21, 2010. | DOI: 10.4103/0970-9371.66694

KUPPUSAMY K, RAJAN A, WARRIER A, NADHAN R, PATRA D AND SRINIVAS P (2019) Cytological Grading of Breast Tumors- The Human and Canine Perspective. **Front Veterinary Science**. v. 6, p. 283. DOI: 10.3389/fvets.2019.00283

KURTZMAN ID, GILBERTSON SR: Prognostic factors in canine mammary tumors. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery**. v. 1, p. 25–32, 1986.

MIOT, H. A. Análise de sobrevivência em estudos clínicos e experimentais. **Jornal Vascular Brasileiro**. [s. l], v. 16, n. 4, p. 267-269, 2017.

MISDORF W, ELSE RW, HELLMEN E, LIPSCOMB TP: Histologic Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat, Vol. 7. **Armed Force Institute of Pathology and World Health Organization**, Washington, DC, 1999.

MISDORF, W. Tumour of mamary gland. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in domestic animals**. 4.ed. Iowa State: California, 2002, p. 788.

ROBINSON IA, MCKEE G, NICHOLSON A, D'ARCY J, JACKSON PA, COOK MG, et al. Prognostic value of cytological grading of fine-needle aspirates from breast carcinomas. **Lancet**. 1994, v. 343, n. 8903, p. 947-949. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)90066-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(94)90066-3) PMID: 7909010

RASOTTO, R.; BERLATO, D.; GOLDSCHMIDT, M.H.; ZAPPULLI, V. Prognostic significance of canine mammary tumor histologic subtypes: an observational cohort study of

229 cases. **Veterinary Pathology**, v.54, n.4, p.571-578, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1177/0300985817698208>

RIBAS, C.R.; DORNBUSCH, P.T.; FARIA, M.R.; WOUK, A.F.P.F.; CIRIO, S.M. **Archives of Veterinary Science**. Alterações clínicas relevantes em cadelas com neoplasias mamárias estadiadas, v. 17, n.1, p. 60-68, 2012.

SCHNEIDER R, DORN CR, TAYLOR DON: Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 43, p. 1249–1261, 1969.

ANNE B. SCHILLER, TALAAT S. TADROS, GEORGE G. BIRDSONG, NORMAN A. GROSSL. Cellular Dyscohesion in Fine-Needle Aspiration of Breast Carcinoma: Prognostic Indicator for Axillary Lymph Node Metastases?, **American Journal of Clinical Pathology**. Volume 115, Issue 2, February 2001, Pages 219–223. DOI: <https://doi.org/10.1309/PR6K-7RXQ-NJUD-443Q>

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

SIMPSON, E.R.; BROWN, K.A. Minireview: obesity and breast cancer: a tale of inflammation and dysregulated metabolism. **Molecular Endocrinology**, v.27, n.5, p.715-725, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1210/me.2013-1011>

SOLANO-GALLEGO, L. Sistema reprodutivo. In: RASKIN, R.E.; MEYER, D.J. **Citologia clínica de cães e gatos - Atlas colorido e guia de interpretação**. 2^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012, p.274-281.

SORENMO, K.U.; RASOTTO, R.; ZAPULLI, 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. DOI: <https://doi.org/10.1177/0300985810389480>

SORENMO, K.U.; WORLEY, D.R; GOLDSCHMIDT, M.H. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN'S, E.G. **Small animal clinical oncology**, 5^aed. ElsevierSaunders: St. Louis, Missouri, p. 538-556, 2013.

YAMAGAMI, T.; KOBAYASHI, T.; TAKAHASHI, K.; SUGIYAMA, M. Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification. **Journal of veterinary medicine science**, v. 58, n. 11, p. 1079-1083, 1996. DOI: https://doi.org/10.1292/jvms.58.11_1079

YILDIRIM F, GUREL A. Comparison between cytological and histopathological evaluations of canine mammary tumours. **Revue de Médecine Vétérinaire**. 2012; v. 163, n. 3, p. 116-122.

GUPTA, K.; PRADEEP, K. Cytological grading of canine mammary tumors and correlation with histological grading. **Veterinary World**, v. 12, n. 1, p. 34-38, 2019.

MEINKOTH, J.H.; COWELL, R.L. Mammary Gland. In: COWELL, R.L.; TYLER, R.D.; MEINKOTH, J.H.; DENICOLA, D.B. *Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat*. 3. ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007. cap. 10, p. 151–161.