

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**VALOR PROGNÓSTICO DA DETEÇÃO DE MACROMETÁSTASES,  
MICROMETÁSTASES E CÉLULAS NEOPLÁSICAS ISOLADAS (ITCs)  
EM LINFONODOS REGIONAIS DE CADELAS COM NEOPLASIA  
MAMÁRIA MALIGNA**

Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária

Ana Teresa Dias Machado

*Orientador:*

Professora Doutora Adelina Maria Gaspar Gama Quaresma



Vila Real, 2019



Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**VALOR PROGNÓSTICO DA DETEÇÃO DE MACROMETÁSTASES,  
MICROMETÁSTASES E CÉLULAS NEOPLÁSICAS ISOLADAS (ITCs)  
EM LINFONODOS REGIONAIS DE CADELAS COM NEOPLASIA  
MAMÁRIA MALIGNA**

Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária

Ana Teresa Dias Machado

*Orientador:*

Professora Doutora Adelina Maria Gaspar Gama Quaresma

**Composição do júri:**

Professora Doutora Maria da Conceição Medeiros de Castro Fontes

Professora Doutora Felisbina Luísa Pereira Guedes Queiroga

Professora Doutora Fernanda Aurora Gomes de Seixas Travassos

Professora Doutora Adelina Maria Gaspar Gama Quaresma

Vila Real, 2019



Dissertação apresentada à Escola de Ciências Agrárias e Veterinárias - Departamento de Ciências Veterinárias - da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.



Declaro por minha honra que a presente dissertação de mestrado é resultado da minha pesquisa e trabalho pessoal e das orientações da minha supervisora. O seu conteúdo é original e todas as fontes consultadas estão devidamente mencionadas no texto e na bibliografia final. Declaro ainda que este trabalho foi redigido especialmente para este fim e que não foi apresentado em nenhuma outra instituição para obtenção de qualquer grau académico.



## **Publicações**

Os resultados deste trabalho foram parcialmente apresentados sob a forma de comunicação oral:

Machado A, Vilhena H, Gama A (2018). Lymph node micrometastases and isolated tumour cells: prognostic significance in canine mammary cancer. XXIII Meeting of the Portuguese Society Animal Pathology. 9-10<sup>th</sup> June, Coimbra, Portugal.



## **Agradecimentos**

Ao longo deste projeto, foram muitas as pessoas e entidades que prestaram o seu contributo e apoio. A elas o nosso sincero agradecimento.

À Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, na pessoa do Magnífico Reitor, manifestamos o nosso agradecimento pelas condições disponibilizadas.

Ao CECAV-UTAD, a disponibilidade de acesso ao equipamento de aquisição de imagem Nikon NIS-Elements D (Projecto PEst-OE/AGR/UI0772/2014).

À Professora Doutora Adelina Gama, orientadora desta dissertação, expresso o meu profundo agradecimento pela dedicação a este projeto, pelos conhecimentos transmitidos, pela sua amizade e paciência e pela disponibilização de meios para a execução da componente prática.

Ao Doutor Hugo Vilhena, pela sua disponibilidade e colaboração neste trabalho.

Às colaboradoras do Laboratório de Histologia e Anatomia Patológica da UTAD pela simpatia, disponibilidade e apoio prestado.

À Beatriz, pela sua amizade e compreensão, pelas conversas partilhadas e pelo apoio e incentivo permanentes.

À Maria João, pela sua amizade e confiança.

Aos meus pais e à Mariana, os meus pilares, pelo vosso amor e apoio incondicionais, por acreditarem em mim e incentivarem a concretização dos meus objetivos. À Mia, minha fiel companheira de 4 patas.

A todos aqueles que se cruzaram neste percurso e de alguma forma contribuíram para a sua concretização, o meu muito obrigado.



## Resumo

Nas neoplasias mamárias malignas da cadela, a avaliação do envolvimento dos linfonodos regionais fornece informação prognóstica relevante. Contudo, o significado clínico da presença de células tumorais isoladas (ITCs) e de micrometástases não está completamente esclarecido, constituindo objetivo deste trabalho avaliar o seu valor prognóstico. Foram selecionadas 75 neoplasias mamárias malignas, acompanhadas de um ou vários linfonodos regionais. Estes foram avaliados a nível histológico com coloração HE e imuno-histoquímica (panqueratina), categorizando-se as metástases em: macrometástases (> 2 mm), micrometástases (0,2-2 mm) e ITCs (< 0,2 mm). Neste estudo, 49 (65,3%) cadelas apresentaram metastização dos linfonodos regionais: 49% (n = 24) evidenciaram macrometástases, 28,6% (n = 14) apresentaram micrometástases e 22,4% (n = 11) apresentaram ITCs. A dimensão dos focos metastásicos dos linfonodos regionais esteve significativamente associada ao tipo histológico (P = 0,030), grau histológico (P = 0,001) e invasão linfovascular (P < 0,0001). A análise da sobrevivência total (ST) revelou que a presença de metástases ganglionares esteve significativamente associada a um pior prognóstico (média 18,7 vs. 11,6 meses, P = 0,013), não se tendo verificado diferenças significativas no estudo da sobrevivência livre de doença (SLD). Após categorização das metástases ganglionares verificaram-se diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos tanto na ST como na SLD (P < 0,0001), apresentando as cadelas com macrometástases taxas de sobrevivência inferiores; as cadelas sem metástases ou com micrometástases/ITCs apresentaram taxas de sobrevivência semelhantes, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos. Neste estudo, a presença de metástases de diâmetro inferior a 2 mm nos linfonodos regionais de cadelas com neoplasias mamárias malignas não demonstrou estar associada a pior prognóstico; no entanto, consideramos fundamentais estudos adicionais, com um maior número de animais, que comprovem estes resultados.

**Palavras-chave:** cadela, neoplasia mamária, linfonodo, metástase, prognóstico



## **Abstract**

In canine malignant mammary tumours, the evaluation of regional lymph node involvement provides relevant prognostic information. However, the clinical significance of isolated tumour cells (ITCs) and micrometastases is not completely clarified. In the present study, 75 canine malignant mammary tumours with regional lymph nodes were selected. Lymph nodes were histologically evaluated by routine histopathology and immunohistochemistry (pankeratin). Metastases were categorized in: macrometastases (> 2 mm), micrometastases (0.2-2 mm) and ITCs (< 0.2 mm). In this study, 49 (65.3%) female dogs exhibited lymph node metastasis: 49% (n = 24) showed macrometastases, 28.6% (n = 14) presented micrometastases and 22.4% (n = 11) presented ITCs. The size of lymph node metastasis was significant associated with histological tumor type (P = 0.030), histological grade (P = 0.001) and lymphovascular invasion (< 0.0001). Overall survival (OS) analysis revealed that the presence of lymph node metastases was significantly associated with poor prognosis (mean 18.7 vs. 11.6 months, P = 0.013); no significant differences were observed for disease free survival (DFS). With lymph node metastasis categorization, statistical significant differences were observed between different groups both in OS and DFS (P < 0,0001), with female dogs with macrometastases showing lower survival rates; female dogs with no metastases or with micrometastases/ITCs presented similar mean survival rates, with no statistical differences between both groups. In this study, the presence of lymph node metastases smaller than 2 mm in female dogs with malignant mammary tumours was not associated with a worse prognosis; additional studies, with a larger case series, are necessary to confirm these findings.

**Keywords:** female dog, mammary tumour, lymph node, metastasis, prognosis



## Índice

I. Revisão Bibliográfica.....	3
1. Introdução.....	3
2. Glândula mamária .....	3
2.1. Desenvolvimento .....	3
2.3. Histologia.....	6
2.4. Drenagem linfática.....	7
3. Neoplasias mamárias .....	10
3.1. Epidemiologia .....	10
3.2. Fatores de risco.....	10
3.3. Apresentação clínica e histopatológica .....	12
3.4. Etiopatogenia.....	13
3.5. Prognóstico.....	14
3.6. Estadiamento tumoral .....	15
3.7. Detecção de metástases ocultas nos linfonodos regionais .....	18
II. Objetivos .....	23
III. Material e Métodos .....	27
1. Material.....	27
2. Avaliação clinicopatológica .....	27
3. Avaliação imuno-histoquímica .....	28
4. Classificação das metástases dos linfonodos regionais.....	29
5. Análise de sobrevivência .....	30
6. Análise estatística.....	30
IV. Resultados.....	33
1. Avaliação clinicopatológica .....	33
2. Avaliação imuno-histoquímica .....	36
3. Classificação das metástases dos linfonodos regionais.....	36
4. Análise estatística.....	37
4.1. Análise comparativa entre o tipo de metástases no linfonodo e os parâmetros clinicopatológicos .....	37
4.2. Análise de sobrevivência .....	41
V. Discussão .....	49
VI. Conclusões .....	59
VII. Referências Bibliográficas.....	63



## **Índice de figuras**

Figura 1. Vascularização e drenagem linfática das glândulas mamárias da cadela.....	8
Figura 2. Categorias de metástases ganglionares.....	17
Figura 3. Histopatologia de linfonodos regionais mamários da cadela.....	38
Figura 4. Curvas Kaplan-Meier de sobrevivência total (ST) .....	45
Figura 5. Curvas Kaplan-Meier de sobrevivência livre de doença (SLD) .....	46



## Índice de quadros

Quadro 1. Drenagem linfática da glândula mamária normal e neoplásica da cadela. ....	9
Quadro 2. Sistema de estadiamento modificado dos tumores mamários da cadela. ....	16
Quadro 3. Técnica de IHQ: anticorpo e procedimento. ....	28
Quadro 4. Frequências observadas na presente série para os parâmetros clínicos. ....	34
Quadro 5. Frequências observadas na presente série para os parâmetros histopatológicos. .....	35
Quadro 6. Imuno-expressão de queratina (K) AE1/AE3 nos linfonodos regionais. ....	36
Quadro 7. Frequências dos tipos de metástases nos linfonodos regionais. ....	37
Quadro 8. Tamanho dos depósitos metastásicos nos linfonodos regionais. ....	37
Quadro 9. Associações entre as características clínicas e o tipo de metástases observadas na presente série. ....	39
Quadro 10. Associações entre os parâmetros histopatológicos e o tipo de metástases observadas na presente série. ....	40
Quadro 11. Análise de sobrevivência total relativamente aos parâmetros clinicopatológicos. .....	41
Quadro 12. Análise da sobrevivência total, considerando diferentes categorias de metastização ganglionar. ....	42
Quadro 13. Análise de sobrevivência livre de doença relativamente aos parâmetros clinicopatológicos. ....	43
Quadro 14. Análise da sobrevivência livre de doença, considerando diferentes categorias de metastização ganglionar. ....	44



## Lista de abreviaturas/Símbolos/Acrónimos

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
C.	Carcinoma
cat.	Categoria
DAB	3, 3 – Diaminobenzidina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogénio
HE	Hematoxilina-Eosina
IgG <sub>1</sub>	Imunoglobulinas G <sub>1</sub>
IHQ	Imuno-histoquímica
ITCs	<i>Isolated tumour cells</i>
LHAP-UTAD	Laboratório de Histologia e Anatomia Patológica da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro
M1	Glândula mamária torácica cranial
M2	Glândula mamária torácica caudal
M3	Glândula mamária abdominal cranial
M4	Glândula mamária abdominal caudal
M5	Glândula mamária inguinal
M	Metástases à distância
M <sub>0</sub>	Ausência de metástases á distância
M <sub>1</sub>	Presença de metástases à distância
n	Número de observações
N	Linfonodos regionais
N <sub>0</sub>	Linfonodo negativo
N <sub>1</sub>	Linfonodo positivo
OMS	Organização Mundial de Saúde
OVH	Ovariohisterectomia
PBS	Tampão fosfato salino
sABC	Complexo estreptavidina-biotina-peroxidase
SLD	Sobrevivência livre de doença
ST	Sobrevivência total
T	Tumor primário

T <sub>1</sub>	Tumor primário < 3 cm
T <sub>2</sub>	Tumor primário 3-5 cm
T <sub>3</sub>	Tumor primário > 5 cm
TA	Temperatura ambiente
TMB	Tumor misto benigno
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>
vs	<i>Versus</i>

h	Hora
min	Minuto
cm	Centímetro
mm	Milímetro
µm	Micrómetro

>	Maior
≥	Maior ou igual
<	Menor
≤	Menor ou igual
±	Mais ou menos
%	Porcentagem
®	Marca registada
™	<i>Trade Mark</i>

## **Capítulo I**

---

Revisão Bibliográfica



## **I. Revisão Bibliográfica**

### **1. Introdução**

A glândula mamária é um órgão especializado da pele, exclusivo dos mamíferos. Trata-se de uma glândula sudorípara apócrina modificada, cuja função lactogénica é essencial para a sobrevivência dos neonatos nos primeiros meses de vida. Cada glândula mamária é constituída por um sistema de ductos e alvéolos, sustentados por estroma fibrovascular e tecido adiposo (Silver, 1966; Sorenmo et al., 2011).

Os processos neoplásicos neste órgão são muito frequentes na cadela, com uma prevalência superior à observada na mulher (Ruberte et al., 1990; Gamlem et al., 2008). As neofomações mamárias podem ter origem em um ou vários dos seus componentes (células epiteliais dos ductos e alvéolos, células mioepiteliais, células mesenquimatosas) e apresentar um amplo espectro de morfologias (Fowler et al., 1974). Prever o seu comportamento biológico e definir a abordagem terapêutica constituem um desafio para os clínicos e patologistas, pelo que existe uma necessidade crescente em identificar parâmetros clínicos, patológicos e moleculares que permitam adequar a resposta terapêutica e estabelecer um prognóstico (Queiroga et al., 2011).

### **2. Glândula mamária**

#### **2.1. Desenvolvimento**

O desenvolvimento da glândula mamária ocorre em distintas etapas. Inicia-se no embrião, em ambos os sexos, e prossegue após o nascimento apenas nas fêmeas. Os estadios finais de desenvolvimento ocorrem somente na fase adulta (pós-púbere), designadamente durante a gestação (Sorenmo et al., 2011; Reese et al., 2014).

A primeira evidência do esboço mamário surge no embrião, por volta dos 25 dias de gestação (Pretzer, 2008), como espessamentos bilaterais lineares da ectoderme, também designados cristas mamárias. Estas estruturas prolongam-se ventralmente desde a base da extremidade anterior (futura região axilar) até à base da extremidade posterior (futura região inguinal). Num complexo sistema de interações moleculares entre folhetos germinativos, as células epiteliais proliferam em profundidade na mesoderme subjacente e coalescem para formar os botões mamários, a partir dos quais surgem múltiplas evaginações em forma de cordões sólidos. As células mesenquimatosas condensam-se em torno dos botões mamários e darão origem ao estroma mamário (Silver, 1966; Hennighausen e Robinson, 2001; Sorenmo et al., 2011). Por um processo de cavitação, formam-se ductos, dos quais

surgem evaginações secundárias que terminam em fundo de saco. Este sistema de ductos rudimentares comunica com o exterior através de uma região de epitélio especializado, situada na superfície de cada botão mamário, que se converterá no mamilo (Silver, 1966; Sorenmo et al., 2011).

Na puberdade, o desenvolvimento da glândula mamária prossegue apenas nas fêmeas, em íntima relação com a fase do ciclo éstrico. Sob influência das hormonas esteróides e peptídicas, o sistema de ductos, até então rudimentar, sofre diferenciação. As porções terminais diferenciam-se em alvéolos com capacidade secretora e os ductos proliferam e ramificam-se. Na fase final da gestação há um incremento na atividade celular e o epitélio alveolar adquire capacidade lactogénica. A alteração do ambiente hormonal que sucede após o parto, com a quebra dos níveis circulantes de progesterona e prolactina, conduz ao processo de involução do tecido mamário. Aos 40 dias após o parto, a porção secretora degenera e apenas se mantém o sistema de ductos (Silver, 1966; Sorenmo et al., 2011).

### **2.2. Anatomia e morfologia**

É durante o período embrionário que se determina o número e a posição das glândulas mamárias. A maioria dos canídeos possui cinco pares de glândulas, localizadas ventralmente de cada um dos lados da linha média. Alterações de número são frequentes, com alguns animais a apresentarem de 8 a 12 glândulas. Tipicamente, encontramos quatro glândulas torácicas (duas craniais e duas caudais), quatro glândulas abdominais (um par cranial e outro caudal) e duas mamas na região inguinal (Silver, 1966). Normalmente as glândulas torácicas são mais pequenas, as abdominais de tamanho intermédio e as inguinais apresentam as maiores dimensões (Evans e Lahunta, 2012).

Cada glândula mamária é composta por parênquima glandular e estroma, que inclui tecido conjuntivo intersticial, vasos sanguíneos, linfáticos, nervos e tecido adiposo. O tecido glandular organiza-se em lóbulos, formados por múltiplos alvéolos e túbulos, que drenam para um ducto principal. Os lóbulos mamários estão separados entre si por septos e constituem a unidade funcional da mama. Os alvéolos, local de síntese e secreção do leite, são revestidos por epitélio cubóide a colunar simples, dependendo da fase secretora, rodeados por células mioepiteliais estreladas e uma membrana basal. As células mioepiteliais têm capacidade contrátil e, em resposta à libertação de oxitocina, são responsáveis pela descida do leite. Os ductos intralobulares de pequeno calibre têm uma morfologia semelhante aos alvéolos, sendo constituídos por uma camada simples de epitélio cubóide sobre uma membrana basal, interpostos por uma camada contínua de células mioepiteliais fusiformes. Estes túbulos convergem para a rede de ductos galactóforos

interlobulares e desembocam num seio lactífero. A nível morfológico observa-se uma transição para um epitélio estratificado com dupla camada de células cuboidais, nas porções mais distais dos ductos. É na região do mamilo que se encontram os seios lactíferos. Estas dilatações do lúmen ductal, delimitadas por esfínteres de músculo liso, são revestidas por epitélio estratificado cubóide. Os seios prolongam-se até à superfície pelos ductos papilares e comunicam com o exterior pelos orifícios papilares do mamilo (Silver, 1966; Monteiro-Riviere, 2006; Sorenmo et al., 2011). O número de ductos que convergem para o mamilo é variável, podendo observar-se desde 7 a 16 (Evans e Lahunta, 2012). Externamente, cada glândula mamária é coberta por pele de epiderme fina e centrada por um mamilo. A porção externa dos mamilos apresenta um revestimento de epitélio estratificado queratinizado e um esfínter, formado por duas camadas de músculo liso, uma interna circular e outra externa longitudinal (Silver, 1966; Monteiro-Riviere, 2006; Sorenmo et al., 2011).

O tecido mamário é intensamente vascularizado. As glândulas torácicas recebem irrigação dos ramos mamários da artéria epigástrica superficial cranial, uma ramificação da artéria torácica interna, e das artérias intercostal e torácica lateral. O aporte sanguíneo às glândulas abdominais craniais também é garantido por ramos dos vasos epigástricos superficiais craniais. As glândulas abdominais caudais e inguinais são irrigadas pelos ramos mamários da artéria epigástrica superficial caudal, que emerge da artéria pudenda externa (Figura 1). Ocorrem anastomoses entre os ramos das artérias epigástricas superficiais craniais e caudais, que irrigam os complexos mamários abdominal e inguinal (Silver, 1966; Evans e Lahunta, 2012).

A vasculatura venosa é formada por uma rede paralela ao circuito arterial (Figura 1). As veias epigástricas superficiais craniais escoam sangue proveniente das mamas torácicas, ao passo que o vaso caudal da veia epigástrica superficial drena os complexos mamários abdominais e inguinais. O sangue é escoado para a veia epigástrica cranial e para a veia pudenda externa, respetivamente. As anastomoses venosas são mais frequentes que as arteriais, podendo os vasos cruzar a linha média ou estabelecer ligações cranio-caudais (Silver, 1966; Evans e Lahunta, 2012).

A drenagem linfática tem especial importância no contexto das neoplasias mamárias malignas, por ser uma via preferencial de disseminação das células epiteliais neoplásicas (Ruberte et al., 1990; Patsikas et al., 2006). A descrição detalhada da anatomia linfática da glândula mamária normal e neoplásica é feita no ponto 2.4 deste capítulo.

As glândulas mamárias recebem inervação sensorial, simpática e parassimpática. As glândulas torácicas craniais são inervadas pelos ramos mamários laterais e mediais dos quarto, quinto e sexto nervos intercostais. As glândulas torácicas caudais são inervadas pelos ramos mamários laterais, dos sexto e sétimo nervos intercostais. Os complexos

abdominais e inguinais recebem inervação do nervo genitofemoral e dos ramos cutâneos ventrais dos nervos ilio-hipogástrico, ilio-hipogástrico cranial e ilioinguinal (Evans e Lahunta, 2012). Fibras nervosas peptidérgicas acompanham a vasculatura sanguínea, regulando o fluxo sanguíneo local, e difundem-se pelo parênquima da glândula atingindo o mamilo e a pele. A presença de neuropéptidos nas fibras nervosas dos mamilos sugere o envolvimento destes neurotransmissores na via aferente do reflexo de ejeção do leite (Pinho e Gulbenkian, 2007).

### **2.3. Histologia**

A estrutura histológica da glândula mamária varia com o sexo, a idade e o estado fisiológico. Nos machos, as glândulas mamárias não sofrem alterações e permanecem órgãos rudimentares na idade adulta. No caso das fêmeas, este órgão sofre um processo de diferenciação, proliferação e involução a cada ciclo éstrico e gestação (Silver, 1966; Sorenmo et al., 2011).

Nos animais pré-púberes, a glândula mamária é formada por estruturas ductais ramificadas com terminações acinares, que se estendem da superfície até à derme. Nesta fase, os ductos são pouco diferenciados e estão delimitados por uma camada simples de epitélio. Nas fêmeas, após a puberdade, o desenvolvimento da glândula mamária é cíclico e hormono-dependente (Nelson e Kelly, 1974; Rehm et al., 2007; Santos et al., 2010). Os estudos existentes acerca da histologia da mama da cadela são discordantes. Nelson e Kelly (1974) observaram proliferação do epitélio ductal e aumento das dimensões da rede de ductos na fase final do proestro, em resposta à estimulação estrogénica. Em estudos mais recentes, Rehm et al. (2007) e Santos et al. (2010) identificaram alterações morfológicas na estrutura glandular apenas a partir do estro, observando proliferação moderada da estrutura tubulo-alveolar e do estroma envolvente. É no diestro que se observa maior proliferação e diferenciação do epitélio glandular, passando a mama a evidenciar um padrão lobular; os níveis elevados de progesterona, característicos da fase inicial do diestro, conduzem ao aumento dos ductos e alvéolos. Sinais de involução são evidentes na fase final do diestro, com presença de apoptose, retração alveolar e fagocitose das secreções por macrófagos. No anestro, o tecido glandular regride completamente, sendo evidente a diminuição do diâmetro dos ácinos e a redução do tamanho dos lóbulos, acompanhadas por aumento da espessura da membrana basal e proliferação intensa do estroma interlobular (Rehm et al., 2007; Santos et al., 2010).

Durante a gestação e lactação verificam-se alterações na altura do epitélio secretor, variações na forma, tamanho e posição dos núcleos e desenvolvimento do retículo

endoplasmático rugoso e complexo de Golgi. As alterações mais pronunciadas ocorrem nos 10 a 15 dias que antecedem o parto. Devido à acumulação de leite nos ácinos, a altura do epitélio diminui e o lúmen dos alvéolos dilata. No citoplasma apical das células epiteliais observam-se numerosas gotículas de gordura e vacúolos secretores e os núcleos apresentam grandes dimensões e nucléolos evidentes. As células mioepiteliais envolvem o epitélio dos ductos excretores e formam uma camada descontínua em redor dos alvéolos. No estroma interalveolar, edemaciado, estão presentes células inflamatórias, na sua maioria macrófagos e linfócitos (Sinowitz et al., 1980; Orfanou et al., 2010).

A involução da glândula mamária é um processo progressivo e ocorre por volta dos dois a três meses após o parto, quando o estímulo da sucção cessa e as concentrações de hormonas já são baixas. O epitélio glandular sofre degenerescência por apoptose e os detritos celulares e secreções presentes no lúmen são fagocitados. O tecido conjuntivo interlobular torna-se abundante e denso; as escassas células epiteliais alveolares apresentam-se achatadas e assentes em células mioepiteliais proeminentes (Sinowitz et al., 1980; Monteiro-Riviere, 2006; Orfanou et al., 2010).

#### **2.4. Drenagem linfática**

Cada complexo mamário tem um plexo de vasos linfáticos próprio ao nível do mamilo, parênquima e estroma, que drena a linfa para um linfonodo regional ipsilateral (Silver, 1966). No entanto, o padrão de drenagem linfática não é regular e constante. Os estudos de linfografia verificaram variações individuais na drenagem linfática, mas também diferenças entre glândulas sem e com alterações neoplásicas (Ruberte et al., 1990; Patsikas e Dessiris, 1996a, 1996b; Pereira et al., 2003; Patsikas et al., 2006).

Na glândula mamária normal (Quadro 1), o plexo linfático do par torácico cranial drena para o linfocentro axilar (Ruberte et al., 1990; Patsikas e Dessiris, 1996; Pereira et al., 2003). No estudo de Patsikas e Dessiris (1996a), observaram-se casos de drenagem simultânea para o linfocentro axilar e cervical superficial. Os complexos mamários torácicos caudais drenam exclusivamente nos linfonodos axilares do lado correspondente. Os vasos linfáticos das glândulas abdominais caudais e inguinais dirigem-se para os linfonodos inguinais superficiais, que fazem parte do linfocentro inguinofemoral (Ruberte et al., 1990; Patsikas e Dessiris, 1996a). Contudo, Pereira et al. (2003) identificou uma minoria de casos com drenagem simultânea nos linfocentros inguinofemoral e poplíteo ipsilaterais. A drenagem da mama abdominal cranial é inconstante devido ao seu posicionamento central entre a região axilar e inguinal (Pereira et al., 2003). Geralmente, a linfa é drenada simultaneamente para os linfonodos axilares e inguinais superficiais ipsilaterais. No entanto, em alguns casos, a

linfa é drenada apenas para os linfonodos axilares ipsilaterais ou, mais raramente, apenas caudalmente, para os linfonodos inguinais superficiais do mesmo lado (Figura 1) (Ruberte et al., 1990; Patsikas e Dessiris, 1996b; Pereira et al., 2003).

Com exceção das glândulas abdominais craniais, que têm comunicações inconstantes com a torácica caudal e abdominal caudal, não existem comunicações linfáticas entre complexos mamários adjacentes nas cadeias mamárias saudáveis (Ruberte et al., 1990). Contudo, Patsikas e Dessiris (1996a) não confirmaram a existência destas anastomoses, mas constataram a ocorrência de fluxo retrógrado, podendo a linfa passar de uma glândula para outra se drenarem para o mesmo linfocentro. Foram observadas anastomoses entre plexos contralaterais por Pereira et al. (2003) e foram demonstradas comunicações entre os linfonodos inguinais superficiais por Patsikas e Dessiris (1996b).

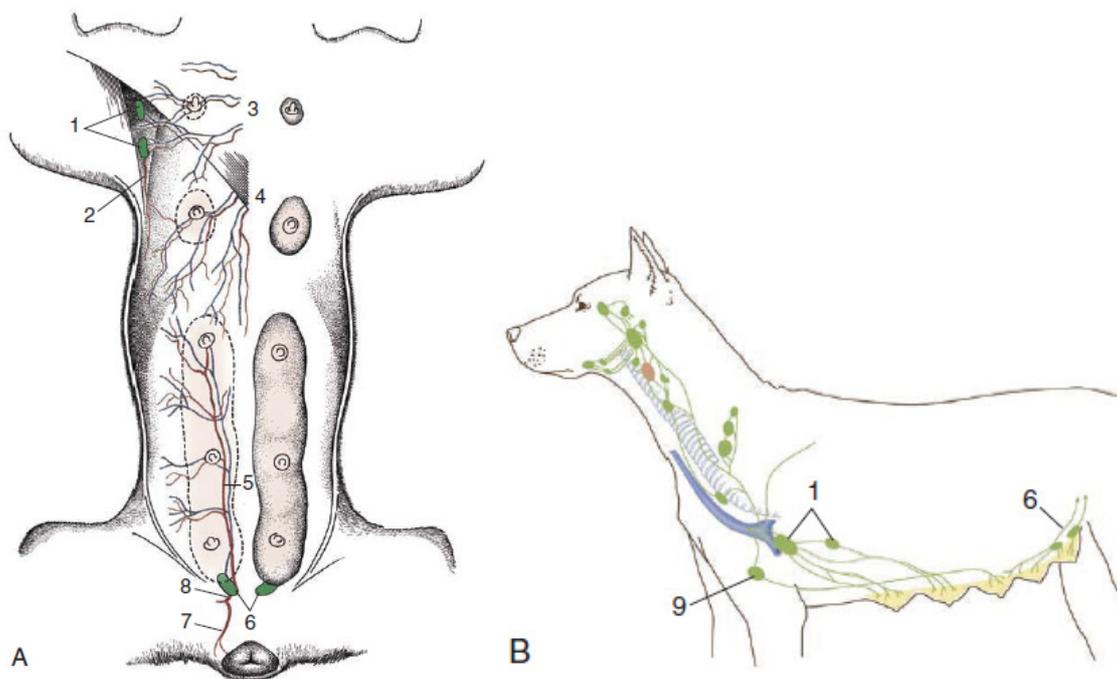


Figura 1. Vascularização e drenagem linfática das glândulas mamárias da cadela. A: localização anatômica e irrigação sanguínea das glândulas mamárias. B: drenagem linfática e linfonodos regionais. 1: linfonodos axilar e axilar acessório; 2: ramo da artéria torácica lateral; 3: ramificações das veias torácicas internas; 4: ramos da veia epigástrica superficial cranial; 5: artéria epigástrica superficial caudal; 6: linfonodos inguinais superficiais; 7: ramo ventral labial para a vulva; 8: artéria pudenda externa; 9: linfonodos esternais. Adaptado de Dyce et al. (2010).

As neoplasias mamárias podem alterar o padrão de drenagem linfática das glândulas mamárias no que diz respeito aos linfocentros e à organização vascular, estabelecendo novas comunicações e recrutando um maior número de linfonodos (Quadro 1). A drenagem dos plexos torácicos pode passar a envolver o linfocentro torácico ventral (linfonodos

esternais) ipsilateral, para além do linfocentro axilar. A glândula mamária abdominal cranial mantém os 3 padrões de drenagem, sendo mais frequente a drenagem nos linfonodos axilares e inguinais superficiais ipsilaterais. Ocasionalmente, a drenagem ocorre exclusivamente para o linfocentro axilar ipsilateral e, raramente, no linfocentro inguinofemoral do mesmo lado. O complexo mamário abdominal caudal drena exclusivamente no linfocentro inguinal superficial, mas foram descritos casos de drenagem simultânea nos linfocentros axilar e inguinofemoral. A glândula mamária inguinal neoplásica pode drenar nos linfonodos inguinais superficiais ou nos poplíteos (Pereira et al., 2003; Patsikas et al., 2006).

As cadelas com neoplasias mamárias apresentam maior número de comunicações linfáticas entre as glândulas mamárias. Verifica-se um incremento das anastomoses contralaterais, designadamente entre as glândulas abdominais caudais e entre as inguinais (Pereira et al., 2003; Patsikas et al., 2006). As alterações no padrão de drenagem linfática, que se verificam nas glândulas mamárias neoplásicas, podem ser explicadas pela linfangiogénese que ocorre no processo neoplásico, em que vasos linfáticos inactivos nas glândulas normais se abrem e se tornam ativos, alterando a rede linfática (Patsikas et al., 2006; Sleenckx et al., 2014).

Geralmente, no linfocentro axilar existem 1 a 2 linfonodos, ocasionalmente 3, em cada lado. Os linfonodos inguinais superficiais são, normalmente, 2 a 3 em cada lado, mais raramente 1 ou 4 (Patsikas e Dessiris, 1996b), localizados dorso-caudalmente ao bordo da glândula mamária inguinal (Dyce et al., 2010). Os vasos eferentes do linfocentro axilar (linfonodos axilares próprios e axilares acessórios) drenam diretamente no ducto torácico. O linfocentro inguinofemoral (linfonodos inguinais superficiais) drena para os linfonodos ilíacos (Evans e Lahunta, 2012).

Quadro 1. Drenagem linfática da glândula mamária normal (Ruberte et al., 1990; Patsikas e Dessiris, 1996a, 1996b; Pereira et al., 2003) e neoplásica da cadela (Ruberte et al., 1990; Pereira et al., 2003; Patsikas et al., 2006).

<b>Glândula Mamária</b>	<b>Drenagem linfática normal</b>	<b>Drenagem linfática neoplásica</b>
Torácica cranial (M1)	Linfonodos axilares	Linfonodos axilares, linfonodos esternais
Torácica caudal (M2)	Linfonodos axilares	Linfonodos axilares, linfonodos esternais
Abdominal cranial (M3)	Linfonodos axilares, linfonodos inguinais superficiais	Linfonodos axilares, linfonodos inguinais superficiais
Abdominal caudal (M4)	Linfonodos inguinais superficiais	Linfonodos inguinais superficiais, linfonodos axilares
Inguinal (M5)	Linfonodos inguinais superficiais	Linfonodos inguinais superficiais, linfonodos poplíteos

### **3. Neoplasias mamárias**

#### **3.1. Epidemiologia**

As neoplasias da glândula mamária representam a segunda patologia oncológica com maior incidência na espécie canina, sendo mesmo a mais frequente em fêmeas adultas inteiras (Dorn et al., 1968; Dobson et al., 2002; Egenvall et al., 2005; Gamlem et al., 2008; Brønden et al., 2010; Grüntzig et al., 2015). Contudo, as taxas de incidência reportadas variam com a região de origem do estudo e as características da população (Brønden et al., 2007; Nødtvedt et al., 2012). Nos anos 60, Dorn et al. (1968) estimaram uma taxa de incidência anual, numa região da Califórnia, de 105 casos de tumores mamários por 100 000 cães e de 257,6 por 100 000 em fêmeas inteiras. Nos estudos epidemiológicos mais recentes, a incidência anual estimada foi de 205 por 100 000 cães no Reino Unido (Dobson et al., 2002), 250 por 100 000 cães no nordeste italiano (Vascellari et al., 2016) e, na Suécia, verificou-se uma incidência de 111 por 10 000 cães (Egenvall et al., 2005).

A proporção de tumores mamários é de cerca de 30% dos tumores de toda a população canina e mais de 50% no caso das fêmeas (Gamlem et al., 2008; Vascellari et al., 2016). Menos de 3% dos casos de neoplasias mamárias são observados em machos (Dorn et al., 1968), apresentando estes um risco 3 a 4 vezes inferior em comparação com as fêmeas (Grüntzig et al., 2016).

#### **3.2. Fatores de risco**

Os estudos epidemiológicos permitiram identificar fatores de risco associados ao desenvolvimento de neoplasias mamárias, nomeadamente a idade, raça, exposição hormonal e ovariectomia (OVH), dieta e condição corporal (Sorenmo, 2003; Sorenmo et al., 2011).

As neoplasias mamárias ocorrem maioritariamente na idade adulta. A incidência antes dos 7 anos é reduzida, sendo quase nula antes dos 5 anos. O risco aumenta com a idade e a maior incidência verifica-se entre os 10 e 12 anos (Dorn et al., 1968; Taylor et al., 1976; Schneider, 1970; Priester, 1979; Egenvall et al., 2005; Vascellari et al., 2016). As alterações benignas da mama surgem em idades mais precoces (7-9 anos) que as alterações malignas (9-11 anos) (Sorenmo et al., 2009; Egenvall et al., 2005; Vascellari et al., 2016). A idade de desenvolvimento dos tumores mamários também depende do porte da raça: está descrito que raças grandes desenvolvem alterações tumorais em idades mais jovens que as raças de pequeno porte (Goldschmidt et al., 2016).

Os cães de raça pura têm maior risco de desenvolver tumores mamários (Dorn et al., 1968; Egenvall et al., 2005; Vascellari et al., 2016). No entanto, as raças que revelam maior risco

variam entre estudos. Na Suíça, Grüntzig et al. (2016), observaram que as raças de pequeno porte são 3 vezes mais afetadas por tumores das glândulas mamárias que as raças de grande porte. Egenvall et al. (2005), num estudo de incidência dos tumores mamários na Suécia, relataram diferenças marcadas entre raças, com as raças English Springer Spaniel, Doberman e boxer a apresentarem o risco mais elevado de desenvolvimento de tumores mamários. Já Vascellari et al. (2016) observaram nas raças Samoiedo, Doberman, Schnauzer e Yorkshire Terrier um risco acrescido de desenvolvimento de tumores mamários malignos em relação à população geral.

A maioria (74%) dos tumores mamários é diagnosticada em cadelas inteiras (Priester, 1979; Vascellari et al., 2016), sendo o risco 40 a 50% inferior nos animais ovariectomizados (Grüntzig et al., 2016). Comparando a idade no momento do diagnóstico, as neoplasias mamárias surgem em fases mais precoces nas fêmeas inteiras do que nas fêmeas ovariectomizadas (Grüntzig et al., 2016; Vascellari et al., 2016). Adicionalmente, o risco de desenvolver tumores mamários diminui significativamente quando a OVH é realizada em animais jovens (Dorn et al., 1968; Schneider et al., 1969; Priester, 1979; Sorenmo et al., 2000). A OVH é um fator protector, reduzindo o risco para 0,5% quando realizada antes do primeiro cio; este efeito diminui nos seguintes cios, sendo o risco de 8% quando realizada antes do segundo cio e já de 26% após o segundo cio (Schneider et al., 1969). Alguns autores verificaram uma redução significativa do risco de tumores mamários em cadelas que realizaram OVH antes dos 2,5 anos, possivelmente por menor período de exposição às hormonas ováricas (Schneider et al., 1969; Taylor et al., 1976; Sorenmo et al., 2000). A OVH depois dos 4 anos não apresenta nenhum efeito protector na incidência de tumores mamários, sendo esta semelhante à das cadelas inteiras (Taylor et al., 1976; Støovring et al., 1997). No entanto, Sorenmo et al. (2000) e Kristiansen et al. (2016) identificaram benefícios em termos de prognóstico na realização de OVH em simultâneo com a cirurgia de excisão das neoplasias mamárias.

Outros factores associados à exposição hormonal, como a pseudogestação, gestação e parto, não revelaram relação com a incidência de tumores espontâneos na mama das cadelas (Schneider et al., 1969; Taylor et al., 1976).

Além do risco associado à exposição a hormonas ováricas, também os tratamentos com progestagénios e estrogénios exógenos constituem um fator de risco (Frank et al., 1979; Rutteman e Misdorp, 1993; Støovring et al., 1997). No estudo de Støovring et al. (1997), o risco de desenvolver tumores mamários foi 2,3 vezes superior em cadelas tratadas com progestinas, quando comparadas ao do grupo controlo.

Alguns estudos apontam para uma correlação entre o tipo de dieta e obesidade e a suscetibilidade ao desenvolvimento de neoplasias mamárias (Shofer et al., 1989; Alenza et

al., 1998; Lim et al., 2015). A idade média de desenvolvimento de neoplasias mamárias é inferior em cadelas com sobrepeso ou obesidade, em relação à idade média de diagnóstico em cadelas com condição corporal normal (Lim et al., 2015). Uma condição de obesidade ao ano de idade e um ano antes do diagnóstico tumoral estão ambas significativamente associadas ao risco de desenvolver tumores na mama (Alenza et al., 1998). Dietas ricas em carnes vermelhas estão associadas a maior risco do que dietas à base de carnes brancas (Alenza et al., 1998). Shofer et al. (1989) reportou uma associação positiva entre dietas proteicas e pobres em gordura e a sobrevivência em cadelas com neoplasias malignas.

### **3.3. Apresentação clínica e histopatológica**

As neoplasias mamárias têm um comportamento biológico heterogêneo e uma apresentação clínica muito variável. Ocorrem com maior frequência nas glândulas abdominais caudais e inguinais. A incidência diminui sucessivamente nas glândulas mais craniais, o que pode estar relacionado com a dimensão das glândulas (Taylor et al., 1976). Os tumores simultâneos (mais do que um tumor presente no momento do diagnóstico na mesma glândula ou noutra) são frequentes, podendo corresponder a 25-70% dos animais com neoformações mamárias (Fowler et al., 1974; Taylor et al., 1976; Kurzman e Gilbertson, 1986; Benjamin et al., 1999; Sorenmo et al., 2009; Gunnes et al., 2017).

As neoplasias podem ser de origem epitelial, mesenquimatosa ou mista. Os tumores malignos (50-70%) são mais frequentes que os benignos (30-50%); dentro dos malignos, os carcinomas são os mais prevalentes (Priester, 1979; Hellmén et al., 1993; Grüntzig et al., 2015; Vascellari et al., 2016).

A metastização local, regional e à distância é muito frequente nas neoplasias mamárias malignas. Misdorp e Hart (1976) detetaram metástases nos linfonodos regionais em 50% dos cães com neoplasias mamárias malignas. Moulton et al. (1986), num estudo numa colónia de Beagles, verificou que 77% dos cães diagnosticados com carcinomas mamários tinham metástases. O risco de disseminação e metastização das células tumorais está relacionado com as características clínicas e histopatológicas do tumor primário. Geralmente, os tumores epiteliais metastizam por via linfática nos linfonodos regionais, pulmão, glândulas mamárias adjacentes ou, raramente, noutros órgãos (fígado, glândula adrenal, osso, coração, baço, tubo digestivo, cavidade abdominal, olho, tiróide, rim, pele, mediastino) (Moulton et al., 1986; Sorenmo, 2003; Rasotto et al., 2012). No caso dos tumores de origem mesenquimatosa, a disseminação ocorre preferencialmente por via hematógica diretamente até ao pulmão (Sorenmo, 2003).

### 3.4. Etiopatogenia

O fenómeno da tumorigénese mamária é complexo e tem origem multifatorial. Diversos fatores moleculares e hormonais estão implicados na transformação neoplásica, que conduz à proliferação, invasão e disseminação celular (Klopfleisch et al., 2011). O fenótipo maligno pode resultar da acumulação de erros genéticos e/ou de falhas nos mecanismos de regulação da expressão génica (mecanismos epigenéticos) (Cullen e Breen, 2016). A sobre-expressão de genes promotores de crescimento (proto-oncogenes e oncogenes), mutações nos genes supressores tumorais e alterações nas vias da apoptose têm sido associados ao desenvolvimento de neoplasias mamárias caninas (Klopfleisch et al., 2011; Rivera e von Euler, 2011).

No caso das neoplasias mamárias da cadela, além das alterações genéticas nos mecanismos de regulação da proliferação celular, vários estudos apontam a influência das hormonas esteróides e peptídicas e dos factores de crescimento na transformação neoplásica (Schneider et al., 1969; Queiroga et al., 2005; Queiroga et al., 2015; Spoerri et al., 2015). As conclusões de alguns estudos sugerem que a exposição a hormonas ováricas ou a esteróides exógenos está relacionada com maior risco de desenvolvimento de tumores mamários e que este risco diminui drasticamente quando as cadelas têm uma exposição limitada a esses fatores desencadeantes (Schneider et al., 1969; Rutteman e Misdorp, 1993; Goldschmidt et al., 2016). As hormonas esteróides, peptídicas e os fatores de crescimento têm uma ação promotora da proliferação do epitélio ductal intralobular e do desenvolvimento tubulo-alveolar, através da ligação a receptores nas células-alvo da glândula mamária. Receptores de estrogénio, de progesterona, prolactina, fator de crescimento epidérmico, entre outros já foram identificados na glândula mamária da cadela, mas a sua participação na histogénese tumoral não está completamente esclarecida (Rutteman e Misdorp, 1993; Nieto et al., 2000; Martín de las Mulas et al., 2002; Gama et al., 2009; Goldschmidt et al., 2016). A produção local, por mecanismos autócrinos/parácrinos, de hormonas esteróides e factores de crescimento no tecido mamário normal e neoplásico também parece ter um papel importante no crescimento e progressão maligna dos tumores mamários (van Garderen et al., 1997; van Garderen e Schalken, 2002; Queiroga et al., 2005, 2008, 2009; Goldschmidt et al., 2016).

A hipótese de que o processo de transformação maligna dos tumores mamários da cadela resulta da progressão de displasias, passando por alterações benignas até culminar em tumores malignos foi proposta com base em algumas evidências: frequente ocorrência de tumores múltiplos, presença simultânea de tumores benignos e malignos, maior risco de desenvolvimento de um novo tumor primário em cadelas com diagnóstico prévio de

carcinoma mamário e forte associação entre a dimensão tumoral e o seu comportamento maligno (Sorenmo et al., 2009, 2013; Klopfleisch, 2016; Gunnes et al., 2017).

A invasão, disseminação e metastização são as etapas finais da progressão maligna. Para que estes processos sejam bem sucedidos, é necessário que as células neoplásicas tenham a capacidade de abandonar o tumor primário, através da desregulação dos mecanismos de adesão celular (Gama et al., 2008; Gama e Schmitt, 2012; Cullen e Breen, 2016), atravessar a membrana basal e entrar em circulação. Já em circulação, as células têm que sobreviver, evadir o sistema imunitário e estabelecer-se como uma massa viável numa nova localização. Quando atingem o órgão alvo, os *clusters* de células neoplásicas e micrometástases têm de adaptar-se ao local de colonização e desenvolver uma rede vascular e, assim, estabelecer-se como uma macrometástase (Hanahan e Weinberg, 2011; Santos e Matos, 2015; Cullen e Breen, 2016).

### 3.5. Prognóstico

Os factores de prognóstico são parâmetros clínicos, patológicos ou moleculares que se caracterizam por revelarem informações acerca da evolução da doença neoplásica e da expectativa de sobrevivência (Webster et al., 2011).

Os estudos de prognóstico realizados em neoplasias mamárias malignas da cadela encontraram várias características clinicopatológicas associadas ao comportamento biológico da doença. Destas, as mais consistentes foram: idade, dimensão tumoral, metastização regional, estadio clínico, tipo histológico e grau histológico (Sorenmo, 2003; Sorenmo et al., 2011).

A idade do animal no momento da cirurgia foi reconhecida como um fator de prognóstico: os animais mais velhos têm tumores mamários mais agressivos e taxas de sobrevivência inferiores (Schneider et al., 1969; Hellmén et al., 1993; Yamagami et al., 1996; Pérez Alenza et al., 1997; Chang et al., 2005).

O tamanho do tumor, o envolvimento dos linfonodos regionais e o estadio clínico são três características fortemente associadas com o prognóstico das neoplasias mamárias da cadela. Os animais com tumores maiores de 3 cm têm pior prognóstico, assim como os animais com metastização regional. Estes dois parâmetros, em conjunto com a metastização à distância, são considerados para o estadiamento dos tumores, estando um estadio clínico mais avançado associado a pior prognóstico (Bostock, 1975; Misdorp e Hart, 1976; Hellmén et al., 1993; Yamagami et al., 1996; Pérez Alenza et al., 1997; Philibert et al., 2003; Chang et al., 2005; Peña et al., 2013; Santos et al., 2013).

Alguns estudos indicam que a realização da OVH em simultâneo com a excisão tumoral tem efeitos positivos na sobrevivência (Sorenmo et al., 2000; Chang et al., 2005; Kristiansen et al., 2016). No entanto, Schneider et al. (1969) e Philibert et al. (2003) não encontraram diferenças significativas na sobrevivência das cadelas ovariectomizadas após o diagnóstico. Quanto a outras características reprodutivas, como gestações, pseudo-gestações, número, duração e irregularidade dos ciclos éstricos e tratamentos hormonais, não parecem estar associadas a pior prognóstico (Hellmén et al., 1993).

A raça, a localização do tumor primário, o número de tumores e o tipo de cirurgia também não parecem ter impacto no prognóstico (Schneider et al., 1969; Misdorp e Hart, 1976; Hellmén et al., 1993; Philibert et al., 2003; Rasotto et al., 2017).

O tipo histológico é um importante indicador de prognóstico. Os sarcomas têm uma evolução mais agressiva e, conseqüentemente, estão associados a maior risco de metastização à distância e recidiva local e a menor sobrevida. Comparativamente, os carcinomas complexos estão associados a um melhor prognóstico do que os carcinomas simples (Misdorp e Hart, 1976; Yamagami et al., 1996). Bostock (1975) concluiu que, de entre os carcinomas, os de morfologia anaplásica têm o pior prognóstico.

O grau histológico é considerado uma fonte importante de informação prognóstica. Tal como nos carcinomas da mama da mulher (Elston e Ellis, 1991), também na cadela os tumores menos diferenciados têm pior prognóstico (Misdorp e Hart, 1976; Gilbertson et al., 1983; Pérez Alenza et al., 1997; Sarli et al., 2002; Karayannopoulou et al., 2005; Peña et al., 2013).

### **3.6. Estadiamento tumoral**

Em 1980, a Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou pela primeira vez um sistema de classificação de tumores para animais domésticos. Os principais objetivos eram criar um sistema universal, aplicável a tumores em qualquer região anatómica, com indicações gerais sobre o plano de tratamento, prognóstico e previsão da resposta ao tratamento, podendo ser complementado com informações da histopatologia e cirurgia (Owen et al., 1980).

À semelhança do sistema de estadiamento usado em Medicina Humana, o sistema proposto pela OMS para os animais domésticos assenta em 3 componentes: dimensão do tumor primário (T), envolvimento dos linfonodos regionais (N) e metástases à distância (M). Estes parâmetros refletem a extensão do processo neoplásico e constituem bons indicadores de prognóstico, como referido (Owen et al., 1980; Amin et al., 2016; Brierley et al., 2017).

No sistema TNM, o diâmetro maior do tumor é usado para classificar em: T<sub>0</sub> (sem evidência de tumor), T<sub>1</sub> (< 3 cm), T<sub>2</sub> (3-5 cm), T<sub>3</sub> (> 5 cm) ou T<sub>4</sub> (qualquer dimensão, carcinoma

inflamatório). O envolvimento dos linfonodos regionais é avaliado por palpação, citologia ou histopatologia e os animais são categorizado em:  $N_0$  (sem metástases nos linfonodos regionas),  $N_1$  (metástase no linfonodo ipsilateral) ou  $N_2$  (metastização bilateral). A pesquisa de metástases à distância nos animais com carcinomas mamários, por radiografia e ultrassonografia, permite classificá-los em:  $M_0$  (ausência de metástases à distância) ou  $M_1$  (presença de metástases à distância). Tendo em consideração as categorias T, N e M, os animais eram classificados num de 4 estadios clínicos (Owen et al., 1980).

Atualmente, a maioria dos oncologistas utiliza uma versão modificada (Quadro 2) do sistema TMN para o estadiamento de cães com tumores mamários epiteliais (não inflamatórios). Nesta nova versão, os estadios I-III classificam os cães de acordo com o diâmetro maior do tumor, incluindo apenas casos sem metastização regional ou à distância; o estadio IV inclui os animais com metástases nos linfonodos regionais ( $N_1$ ), independentemente do tamanho do tumor, mas sem metástases à distância, e o estadio V agrega os animais com metástases à distância ( $M_1$ ), independentemente de T ou N (Rutteman et al., 2001; Goldschmidt et al., 2016). Este estadiamento TNM modificado reflete melhor as diferenças em termos de resposta terapêutica e prognóstico entre o aumento do tamanho tumoral, o envolvimento dos linfonodos regionais e a metastização à distância, uma vez que a classificação original sugeria que os tumores de grandes dimensões e a presença de metástases regionais tinha o mesmo significado prognóstico (Owen et al., 1980; Rutteman et al., 2001; Sorenmo et al., 2011).

O estadio clínico está diretamente relacionado com o prognóstico e resposta terapêutica: estadios avançados estão associados a tumores com comportamento mais agressivo, de crescimento mais rápido, de maiores dimensões e maior capacidade de metastização, tendo, por isso, pior prognóstico e necessidade de medidas terapêuticas adjuvantes (Sorenmo et al., 2011).

Quadro 2. Sistema de estadiamento modificado dos tumores mamários da cadela (Rutteman et al., 2001; Goldschmidt et al., 2016).

<b>Estadio</b>	<b>Tamanho do tumor primário (T)</b>	<b>Linfonodos regionais (N)</b>	<b>Metástases (M)</b>
I	$T_1$	$N_0$	$M_0$
II	$T_2$	$N_0$	$M_0$
III	$T_3$	$N_0$	$M_0$
IV	Qualquer T	$N_1$	$M_0$
V	Qualquer T	Qualquer N	$M_1$

$T_1$ : < 3 cm;  $T_2$ : 3-5 cm;  $T_3$ : >5 cm;  $N_0$ : ausente;  $N_1$ : presente;  $M_0$ : ausente;  $M_1$ : presente

O sistema TNM de estadiamento dos tumores malignos do Homem desenvolvido pela *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* e pela *Union for International Cancer Control (UICC)* inclui duas classificações: a classificação clínica (cTNM) e a classificação patológica (pTNM). As categorias pT, pN, e pM são determinadas com base nas observações histopatológicas pós-cirúrgicas, fornecendo a classificação pTNM orientações para a terapia adjuvante e informação adicional sobre o prognóstico (Amin et al., 2016; Brierley et al., 2017).

A caracterização patológica dos linfonodos regionais (pN) dos carcinomas da mama da mulher tem como critérios a ausência (pN<sub>0</sub>) ou presença de metástases (pN<sub>1</sub>) e, além disso, o tipo de metástase nos linfonodos regionais. Os depósitos metastásicos dos linfonodos regionais são agrupados em 3 categorias: ITCs (*Isolated Tumour Cells*), micrometástases e macrometástases (Figura 2). As ITCs são células isoladas ou pequenos agregados de células com dimensão inferior ou igual a 0,2 mm ou no máximo 200 células numa única secção do corte histológico. Os depósitos metastásicos com dimensão superior a 0,2 mm e inferior ou igual a 2 mm ou contagens celulares superiores a 200 células são considerados micrometástases. As macrometástases são focos metastásicos com mais de 2 mm nas suas maiores dimensões. Num linfonodo regional pode haver múltiplos focos de metástases, mas para a categorização patológica apenas é considerado o de maiores dimensões (Amin et al., 2016; Brierley et al., 2017).

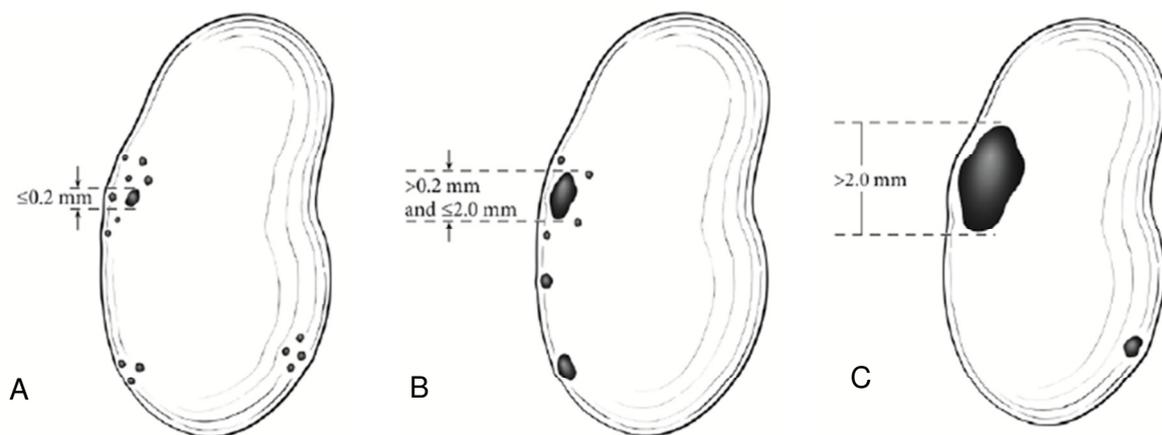


Figura 2. Categorias de metástases ganglionares. A: *clusters* e células tumorais isoladas (ITCs) num linfonodo (os depósitos não excedem os 0,2 mm ou menos de 200 células neoplásicas); B: micrometástases num linfonodo (pelo menos um foco metastásico maior que 0,2 mm e menor ou igual a 2 mm ou contagem de células igual ou superior a 200); C: macrometástase num linfonodo (pelo menos um foco metastásico com mais de 2 mm). Adaptado de Amin et al. (2016).

No sistema de estadiamento dos carcinomas da mama da mulher, os linfonodos regionais apenas com ITCs são considerados negativos ( $N_0$ ) e são excluídos da contagem total de linfonodos positivos (Amin et al., 2016; Brierley et al., 2017). O mesmo não acontece no sistema de estadiamento dos carcinomas da mama da cadela, em que se considera apenas o envolvimento dos linfonodos regionais, independentemente do tipo de metástase (Owen et al., 1980; Rutteman et al., 2001; Goldschmidt et al., 2016). A relação entre a presença de ITCs e micrometástases nos linfonodos regionais e o prognóstico ainda não foi completamente esclarecida. Alguns estudos em carcinoma da mama da mulher concluíram que as ITCs não têm significado prognóstico (Reed et al., 2009; Ahmed et al., 2014), outros não encontraram associação entre micrometástases e um pior prognóstico (Kahn et al., 2006; Gobardhan et al., 2011; Houvenaeghel et al., 2014). Em oposição, há autores que sugerem que metástases ocultas com menos de 2 mm nos linfonodos regionais são um importante fator de prognóstico, estando relacionado com a ocorrência de recidivas e a diminuição da sobrevivência em mulheres com neoplasia mamária (de Boer et al., 2009; de Boer et al., 2010; Weaver et al., 2011; Andersson et al., 2018).

### **3.7. Detecção de metástases ocultas nos linfonodos regionais**

A histopatologia continua a ser a metodologia de rotina no diagnóstico das neoplasias mamárias caninas. No entanto, a aplicação de métodos imuno-histoquímicos tem adquirido importância na definição/confirmação do diagnóstico e na identificação de biomarcadores moleculares com relevância prognóstica (Ramos-Vara et al., 2008; Gama, 2011; Peña et al., 2014). Adicionalmente, a técnica de imuno-histoquímica (IHQ) pode ser uma ferramenta útil na identificação de metástases ocultas (< 2 mm) em linfonodos negativos de cadelas com carcinomas mamários (Peña et al., 2014), tal como em metástases regionais de tumores da mama da mulher (Cserni et al., 2006).

As ITCs e micrometástases podem ser detectadas por avaliação histológica de rotina ou por métodos imuno-histoquímicos (Cote et al., 1999; Turner et al., 2001; Lester et al., 2009). Alguns estudos em patologia humana (Cserni et al., 2006) e veterinária (Matos et al., 2006; Casey et al., 2016; Coletto et al., 2018) verificaram que a avaliação imuno-histoquímica dos linfonodos regionais negativos aumenta a probabilidade de identificação de focos metastásicos de pequenas dimensões, que passam despercebidos na avaliação histopatológica de rotina. Matos et al. (2006) detetaram micrometástases em 9% dos linfonodos diagnosticados como negativos na avaliação histopatológica, o que levou à alteração do estadiamento clínico em 12,5% das cadelas com tumores mamários caninos. Recentemente, num estudo que envolveu cães com carcinomas de diversas origens diagnosticados histologicamente como não metastásicos, a avaliação imuno-histoquímica de

secções seriadas dos linfonodos regionais revelou a presença de micrometástases ou ITCs em 25% dos casos (Casey et al., 2016). Corroborando estes resultados, também Coletto et al. (2018) concluíram que o exame histopatológico tem menor sensibilidade na detecção de metástases ocultas. Nesse estudo, a imunomarcagem dos linfonodos regionais aumentou a identificação de ITCs e micrometástases em 35% e 3%, respectivamente, comparando com a avaliação histopatológica (Coletto et al., 2018).

As queratinas (K) são filamentos intermediários do citosqueleto das células epiteliais. Esta família de proteínas subdivide-se em dois grupos: tipo I (K9-20), queratinas ácidas de baixo peso molecular; e tipo II (K1-8), queratinas básicas de elevado peso molecular (Ordóñez, 2013; Miettinen, 2014). As células epiteliais da glândula mamária da cadela expressam as queratinas ácidas K18 e K19 e as queratinas básicas K7 e K8, ao passo que as células basais/mioepiteliais expressam as queratinas ácidas K14 e K17 e as queratinas básicas K5 e K6 (Peña et al., 2014; Goldschmidt et al., 2016). As células neoplásicas de origem epitelial mantêm geralmente o mesmo padrão de imuno-expressão de queratinas. Considerando estes aspetos, a utilização de um anticorpo anti-queratinas de largo espectro, como o clone AE1/AE3, possibilita a detecção de células de origem epitelial e, deste modo, a identificação de focos metastásicos em linfonodos regionais considerados negativos no exame histopatológico (Sorenmo et al., 2011; Peña et al., 2014). Porém, a relevância prognóstica da detecção imuno-histoquímica de metástases ocultas é ainda pouco conhecida (Peña et al., 2014).



## Capítulo II

---

Objetivos



## II. Objetivos

Com o propósito de contribuir para o conhecimento do comportamento biológico dos tumores de mama da cadela, designadamente do processo de metastização regional e da sua relação com a progressão da doença neoplásica, estabeleceram-se os seguintes objetivos:

- caracterização clínica e histopatológica de uma série de tumores mamários malignos de cadela;
- pesquisa de metástases ocultas nos linfonodos mamários regionais através da técnica de imuno-histoquímica, usando um anticorpo anti-queratinas;
- avaliação do potencial valor prognóstico da deteção de macrometástases, micrometástases e ITCs em linfonodos regionais de cadelas com tumores mamários malignos, baseado num estudo de sobrevivência total e sobrevivência livre de doença.



## **Capítulo III**

---

Material e Métodos



### **III. Material e Métodos**

#### **1. Material**

Neste estudo foram selecionados casos do arquivo do Laboratório de Histologia e Anatomia Patológica da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (LHAP-UTAD), Vila Real, recebidos entre os anos 1999 e 2016. Foram incluídas 75 neoplasias mamárias malignas de cadela, acompanhadas de um ou vários linfonodos regionais. Nenhum animal foi submetido a qualquer terapia adjuvante.

As amostras foram obtidas por cirurgia (mastectomia regional ou radical), fixadas em formol tamponado a 10% e enviadas para o LHAP-UTAD para diagnóstico. O material foi processado de acordo com o procedimento de rotina para a microscopia de luz. Dos blocos de parafina selecionados, foram efetuados cortes com 3 µm de espessura para avaliação histológica e para a técnica de imuno-histoquímica.

#### **2. Avaliação clinicopatológica**

Os dados clínicos recolhidos e analisados incluíram: idade, raça, estado reprodutivo (inteira, ovariectomizada durante cirurgia ou ovariectomizada antes do desenvolvimento do tumor), história de administração de contraceptivos e características do tumor (tamanho e localização).

Após excisão cirúrgica, as cadeias mamárias foram examinadas para identificação, localização e medição de lesões neoplásicas. As glândulas mamárias foram identificadas como torácica cranial e caudal (M1 e M2, respetivamente), abdominal cranial e caudal (M3 e M4, respetivamente) e inguinal (M5). Os tumores foram categorizados quanto ao seu maior diâmetro, de acordo com a classificação TNM para tumores em animais domésticos, proposta pela OMS, em: tumores com menos de 3 cm, tumores de 3 a 5 cm e tumores com diâmetro superior a 5 cm (Owen et al., 1980; Sorenmo et al., 2013).

O diagnóstico histológico foi realizado de acordo com a nova proposta de classificação da OMS para tumores mamários caninos (Goldschmidt et al., 2011). Para além do tipo histológico, determinou-se o grau histológico e a presença de invasão linfovascular (presente vs. ausente) e metastização dos linfonodos (presente vs. ausente).

O grau histológico foi determinado aplicando o método de Nottingham modificado para carcinomas mamários da mulher, proposto por Elston e Ellis (1998), que assenta na avaliação de 3 critérios morfológicos: formação de túbulos, pleomorfismo nuclear e número

de mitoses. Com base nestes critérios, os carcinomas classificaram-se em grau I (bem diferenciados), grau II (moderadamente diferenciados) ou grau III (indiferenciados).

Todos os linfonodos foram registados e seccionados longitudinalmente ao longo do eixo maior, de forma seriada, a cada 2 mm de espessura e inspecionados macroscopicamente para a presença de metástases. Na presença de metástase macroscópica, efetuou-se pelo menos uma secção representativa da metástase. Não existindo metástase visível, todas as secções foram incluídas e dispostas de forma a todas as superfícies de corte estarem representadas na preparação histológica (Lester et al., 2009). Todos os linfonodos foram analisados após coloração hematoxilina-eosina (HE) quanto à presença de metástases, sendo os depósitos metastáticos classificados de acordo com a sua dimensão após coloração imuno-histoquímica (ver ponto 4).

### 3. Avaliação imuno-histoquímica

Para confirmar/detetar a presença de células epiteliais neoplásicas nos linfonodos em análise, foi executada a técnica de imuno-histoquímica (Peña et al., 2014), de acordo com o método indireto do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (sABC), em secções seriadas dos blocos de parafina avaliados em HE (Quadro 3).

Utilizou-se um anticorpo monoclonal anti-queratinas de largo espectro (anti-panqueratina, clone AE1/AE3, M3515<sup>1</sup>), numa diluição de 1:50, para a marcação de células de origem epitelial (Peña et al., 2014). Neste *cocktail*, o clone AE1 imunorreage contra a maioria das queratinas tipo I (queratinas 10, 13, 14, 15, 16, 19) e o clone AE3 reconhece as queratinas tipo II (queratinas 1-8) (Ordóñez, 2013; Miettinen, 2014).

Quadro 3. Técnica de imuno-histoquímica (IHQ): anticorpo e procedimento.

Anticorpo	Fabricante	Clone	Isotipos	Diluição	Recuperação antigénica	Incubação	Revelação
Panqueratina	Dako, Glostrup, Dinamarca	AE1/AE3	IgG <sub>1</sub> , kappa	1:50	Tampão citrato 3x5' micro-ondas	2 h, TA	Estreptavidina-Biotina

TA: Temperatura ambiente

<sup>1</sup> Dako, Glostrup, Dinamarca

Previamente, procedeu-se à desparafinação e rehidratação dos cortes histológicos através de passagens por: xilol (20 min), soluções alcoólicas de concentração decrescente (100%, 95%, 80%, 70%; 5 min cada) e água destilada (5 min). Seguidamente, as preparações, imersas em tampão citrato (pH = 6,0 ± 0,2), foram submetidas a 3 ciclos de 5 min de tratamento térmico em micro-ondas, para recuperação antigénica. Após um período de 30 min de arrefecimento, à temperatura ambiente (TA), procedeu-se à inativação das peroxidases endógenas com peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 3%, durante 30 min. As secções foram lavadas durante 5 min com tampão fosfato salino (PBS) e incubadas (5 min, TA) com Novocasta™ Protein Block<sup>2</sup>, para eliminação das ligações não específicas. O excesso de soro universal foi removido e as secções histológicas foram incubadas com o anticorpo primário (panqueratina) em câmara húmida, durante 2 h, à TA. Após incubação e lavagem com PBS, aplicou-se Lab Vision™ Biotinylated Goat anti-Polyvalent<sup>3</sup>, por 10 min, seguido de lavagem em PBS e incubação com Lab Vision™ Streptavidin Peroxidase<sup>3</sup>. A revelação foi realizada por incubação das lâminas durante 10 min com a solução substrato/cromogénio Novolink™ Max DAB (Polymer)<sup>2</sup>. A reação do cromogénio, 3,3'-diaminobenzidina (DAB), com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produz um precipitado, de cor castanha, no local do antigénio. Seguiu-se lavagem em água corrente, durante 10 min, para remoção do excesso. Por último, as preparações foram contrastadas com hematoxilina de Gill (1 min), desidratadas e montadas com Entellan<sup>®4</sup>.

A glândula mamária/pele adjacente foi utilizada como controlo positivo interno. Para controlo negativo substituiu-se o anticorpo primário por PBS. A expressão de queratinas foi considerada positiva na presença de marcação de cor castanha ao nível do citoplasma, independentemente da intensidade.

#### **4. Classificação das metástases dos linfonodos regionais**

Os linfonodos que, após coloração imuno-histoquímica, evidenciaram a presença de células epiteliais imunorreativas, foram diagnosticados como positivos. O diâmetro maior das metástases e células isoladas foi aferido em milímetros. Sempre que foi identificado mais do que um foco metastásico na mesma secção de corte, foi considerado para a categorização das metástases aquele que tinha maior diâmetro. Nos casos em que as metástases apresentavam dimensões superiores a 3 mm, o seu diâmetro foi aferido macroscopicamente.

---

<sup>2</sup> Leica Biosystems, Newcastle, Reino Unido

<sup>3</sup> Thermo Fisher Scientific, Cheshire, Reino Unido

<sup>4</sup> Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha

As metástases foram classificadas de acordo com os critérios estabelecidos pela AJCC e UICC (Amin et al., 2016) para os carcinomas mamários da mulher. Neste sistema de classificação (pTNM), as metástases categorizam-se de acordo com a extensão do envolvimento do linfonodo em: ITCs (aglomerados de células com dimensão  $\leq 0,2$  mm, células isoladas ou contagens  $\leq 200$  células numa secção de corte do linfonodo), micrometástases (pelo menos um depósito com dimensão  $> 0,2$  mm e  $\leq 2$  mm, ou  $> 200$  células isoladas) e macrometástases (pelo menos um depósito metastático com diâmetro  $> 2$  mm). Os dados morfométricos e imagens foram obtidos através do sistema de análise de imagem NIS-Elements Documentation<sup>5</sup>.

## 5. Análise de sobrevivência

Após o procedimento cirúrgico, os animais foram acompanhados por um período mínimo de 12 meses (4 - 24 meses) pelo clínico responsável. Foram monitorizados para a ocorrência de recidiva local e metastização à distância. O seguimento pós-cirúrgico foi possível em 48 dos casos em estudo; os restantes foram excluídos por morte após cirurgia, não comparecimento às consultas e, em casos mais antigos, falta de registos clínicos.

A sobrevivência total (ST) foi definida como o período de tempo, em meses, entre a cirurgia e a morte natural ou por eutanásia relacionadas com a doença neoplásica. A sobrevivência livre de doença (SLD) foi estipulada como o período de tempo, em meses, entre a cirurgia e a ocorrência de recidivas e/ou metastização.

## 6. Análise estatística

Para o estudo estatístico da associação entre a metastização nos linfonodos e as variáveis clinicopatológicas foi usado o teste de Qui-quadrado e o teste exacto de Fisher. O estudo de sobrevivência foi realizado com recurso ao método Kaplan-Meier, tendo sido os animais agrupados em 2 (ausente vs. presente), 3 (ausente vs. ITC/micrometástase vs. macrometástase) ou 4 categorias (ausente vs. ITCs vs. micrometástase vs. macrometástase) relativamente à presença de metástases nos linfonodos; na comparação de taxas de sobrevivência foi aplicado o teste de log-rank.

Os testes estatísticos foram realizados no software IBM SPSS<sup>®</sup> Statistics 24. Associações com valores de  $P < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significativas.

---

<sup>5</sup> Nikon Corporation, Tóquio, Japão

## **Capítulo IV**

---

Resultados



## IV. Resultados

### 1. Avaliação clinicopatológica

As características clínicas da série de tumores estudada apresentam-se no Quadro 4.

A recolha da informação clínica relativa à idade e à raça foi possível em 63 e 69 casos, respetivamente. A média de idades das cadelas no momento da cirurgia foi  $9,9 \pm 2,6$  anos (4-16 anos). Para o estudo estatístico e com base na média de idades, agruparam-se os animais em dois grupos etários: < 10 anos (n = 28; 44,4%) e  $\geq 10$  anos (n = 35; 55,6%). Os animais de raça indeterminada (n = 33; 47,8%) constituíram o grupo mais frequente nesta série. No que respeita às raças puras, as mais representadas foram Serra da Estrela (n = 4, 5,8%), Caniche (n = 4, 5,8%) e Cocker spaniel (n = 3, 4,3%). Para efeitos estatísticos, as restantes raças (n=25; 36,2%) foram agrupadas num único grupo.

Os dados reprodutivos mostraram que, de 49 cadelas, apenas 10 (20,4%) tinham realizado OVH prévia à excisão do(s) tumor(es) e 39 (79,6%) eram fêmeas inteiras aquando do desenvolvimento tumoral. Informação relativa à utilização de contraceção hormonal foi possível em 20 animais, dos quais somente um (4,8%) tinha sido previamente medicado.

As dimensões tumorais (n=71) variaram entre 0,4 cm e 17,5 cm e a média situou-se nos  $4,83 \pm 3,66$  cm. Da aferição do diâmetro maior dos tumores verificou-se que 31% (n = 22) dos casos tinham tumores com menos de 3 cm, 32,4% (n = 23) tinham entre 3 e 5 cm e 36,6% (n = 26) tinham diâmetro superior a 5 cm. Nos 65 casos em que foi possível apurar a localização, as glândulas mamárias abdominais caudais e inguinais (M4/M5) foram as localizações mais frequentes dos tumores (n = 37; 56,9%). Nódulos com localização nas glândulas mais craniais, designadamente M1, M2 e M3, foram menos observados (n = 11; 16,9%). Lesões com localização múltipla estiveram presentes em 26,2% (n = 17) das cadelas.

As características histopatológicas da série analisada estão detalhadas no Quadro 5. Neste estudo, os tipos histológicos mais frequentes foram o carcinoma tubulopapilar (n = 29; 38,7%), seguido por carcinoma sólido (n = 17; 22,7%), carcinoma complexo (n = 12; 16%) e carcinosarcoma (n = 6; 8%). Os tipos histológicos menos observados foram o carcinoma anaplásico, carcinoma adenoscamoso, carcinoma de células fusiformes, comedocarcinoma, carcinoma micropapilar, carcinoma de células escamosas e carcinoma em tumor misto benigno (TMB), que não foram considerados para análise estatística.

## IV Resultados

Quadro 4. Frequências observadas na presente série para os parâmetros clínicos.

<b>Parâmetro clínico</b>	<b>Frequência n (%)</b>
Idade (n=63)	
<10 anos	28 (44,4)
≥10 anos	35 (55,6)
Raça (n=69)	
Indeterminada	33 (47,8)
Serra da Estrela	4 (5,8)
Caniche	4 (5,8)
Cocker spaniel	3 (4,3)
Outras	25 (36,2)
Ovariohisterectomia (n=49)	
Não	24 (49)
Sim, durante a cirurgia	15 (30,6)
Sim, antes do desenvolvimento tumoral	10 (20,4)
Contraceção (n=21)	
Não	20 (95,2)
Sim	1 (4,8)
Tamanho (n=71)	
<3 cm	22 (31)
3-5 cm	23 (32,4)
>5 cm	26 (36,6)
Localização (n=65)	
M1/M2	5 (7,7)
M3	6 (9,2)
M4/M5	37 (56,9)
Múltipla	17 (26,2)

Relativamente ao grau histológico, as 75 neoplasias foram classificadas em: grau I (n = 8; 10,7%), grau II (n = 31; 41,3%) e grau III (n = 36; 48%). A invasão linfocelular foi identificada em 48% (n = 36) dos casos.

Os linfonodos avaliados contabilizaram um total de 139, com um número médio de  $1,85 \pm 0,82$  por animal (variação de 1-4 linfonodos por animal). A avaliação histológica de rotina dos linfonodos regionais revelou a presença de células epiteliais neoplásicas em 48 (64%) dos 75 casos.

Quadro 5. Frequências observadas na presente série para os parâmetros histopatológicos.

<b>Parâmetro histopatológico</b>	<b>Frequência n (%)</b>
Tipo histológico (n=75)	
Carcinoma tubulopapilar	29 (38,7)
Carcinoma sólido	17 (22,7)
Carcinoma complexo	12 (16)
Carcinossarcoma	6 (8)
Carcinoma anaplásico	2 (2,7)
Carcinoma adenoscamoso	2 (2,7)
Carcinoma de células fusiformes	2 (2,7)
Comedocarcinoma	2 (2,7)
Carcinoma micropapilar	1 (1,3)
Carcinoma de células escamosas	1 (1,3)
Carcinoma em TMB	1 (1,3)
Grau histológico (n=75)	
Grau I	8 (10,7)
Grau II	31 (41,3)
Grau III	36 (48)
Invasão linfovascular (n=75)	
Ausente	39 (52)
Presente	36 (48)
Metastização ganglionar (n=75)	
Ausente	27 (36)
Presente	48 (64)

## 2. Avaliação imuno-histoquímica

A avaliação da imunorreatividade ao anticorpo panqueratina demonstrou a presença de células epiteliais neoplásicas em linfonodos regionais de 48 (64%) cadelas, das 75 em estudo (Quadro 6). Verificou-se discordância entre a avaliação histopatológica e imuno-histoquímica em dois casos. Num deles, na secção corada com HE não havia evidências de metastização, mas detetou-se imuno-expressão de queratinas num aglomerado de células epiteliais com 0,05 mm de diâmetro maior, localizado no seio subcapsular. No segundo caso, na análise histopatológica de rotina observaram-se escassas ITCs ao nível dos seios subcapsulares de um dos linfonodos regionais, observação que não foi confirmada pelo exame imuno-histoquímico, provavelmente devido ao desbaste do linfonodo, que não revelou ITCs adicionais. Contudo, considerou-se este caso como sendo positivo, uma vez que havia evidências de metastização no linfonodo na avaliação histopatológica de rotina.

Quadro 6. Imuno-expressão de queratina (K) AE1AE3 nos linfonodos regionais.

K AE1AE3	Frequência n (%)
Linfonodo negativo	27 (36)
Linfonodo positivo	48 (64)
Total	75 (100)

## 3. Classificação das metástases dos linfonodos regionais

Considerando a avaliação histopatológica e imuno-histoquímica dos linfonodos, 49 (65,3%) cadelas apresentaram envolvimento regional e 26 (34,7%) não apresentaram evidências de metastização nos linfonodos. Dos casos positivos com mais de um linfonodo isolado (33/49), a maioria apresentou metástases em todos os linfonodos (n = 28; 84,8%).

Os linfonodos positivos apresentaram desde escassas células epiteliais neoplásicas ao nível dos seios subcapsulares e medulares, passando por células ou aglomerados disseminados por todo o parênquima ganglionar, até casos de metastização extensa (Figura 3), verificando-se, em alguns casos, substituição total do parênquima linfóide e alterações profundas da arquitetura ganglionar.

Aplicando os critérios pTNM para a categorização das metástases dos tumores de mama da mulher e considerando a dimensão do maior foco metastásico observado, apuraram-se: 24 (49%) macrometástases, 14 (28,6%) micrometástases e 11 (22,4%) ITCs (Quadro 7). As dimensões das ITCs variaram entre 35  $\mu$ m (0,035 mm) e 150  $\mu$ m (0,150 mm), com uma média de 84  $\pm$  4  $\mu$ m (0,084  $\pm$  0,040 mm). As micrometástases mensuráveis (12/14)

apresentaram  $0,776 \pm 0,532$  mm de média de eixo maior, com mínimo de 0,21 mm e máximo 1,8 mm (os restantes dois casos corresponderam à presença de mais de 200 células isoladas). As macrometástases ( $n = 24$ ) apresentaram dimensões médias de  $10,757 \pm 6,559$  mm, com variação entre 2,16 mm e 2,5 cm (2,158-25 mm) (Quadro 8).

Quadro 7. Frequências dos tipos de metástases nos linfonodos regionais.

<b>Metástase ganglionar</b>	<b>Frequência n (%)</b>
ITCs	11 (22,4)
Micrometástases	14 (28,6)
Macrometástases	24 (49)
Total	49 (100)

Quadro 8. Tamanho dos depósitos metastásicos nos linfonodos regionais.

<b>Tamanho das Metástases</b>	
ITCs	$0,084 \pm 0,040$ mm (0,035-0,150 mm)
Micrometástases	$0,776 \pm 0,533$ mm (0,21-1,8 mm)
Macrometástases	$10,757 \pm 6,559$ mm (2,158-25 mm)

As metástases regionais mantiveram, na maioria dos casos, o padrão morfológico do tumor primário, destacando-se como mais frequentes os padrões sólido e papilar/micropapilar, por vezes associados à presença de áreas de necrose. Observaram-se linfonodos com população metastásica bifásica de células epiteliais e mioepiteliais, raramente associada a metaplasia condroide.

#### **4. Análise estatística**

##### **4.1. Análise comparativa entre o tipo de metástases no linfonodo e os parâmetros clinicopatológicos**

Nos Quadro 9 e Quadro 10 encontram-se detalhadas as associações entre o tipo de metástases nos linfonodos e as características clínicas e histopatológicas, respetivamente.

Analisando a presença vs. ausência de metastização nos linfonodos regionais, observaram-se diferenças entre os grupos dos tumores com menos de 3 cm, tumores com 3 a 5 cm e tumores com mais de 5 cm. Verificou-se que a presença de metástases nos linfonodos regionais esteve associada a um maior tamanho do tumor primário ( $P = 0,033$ ). No entanto,

#### IV Resultados

quando considerado o tipo de metástase presente, não existem diferenças estatisticamente significativas, apesar de cadelas com tumores com dimensão inferior a 3 cm revelarem menor metastização regional (n = 12; 54,5%), e a frequência mais elevada de macrometástases se verificar nas cadelas com tumores com mais de 5 cm (n = 10; 38,5%; P = 0,075).

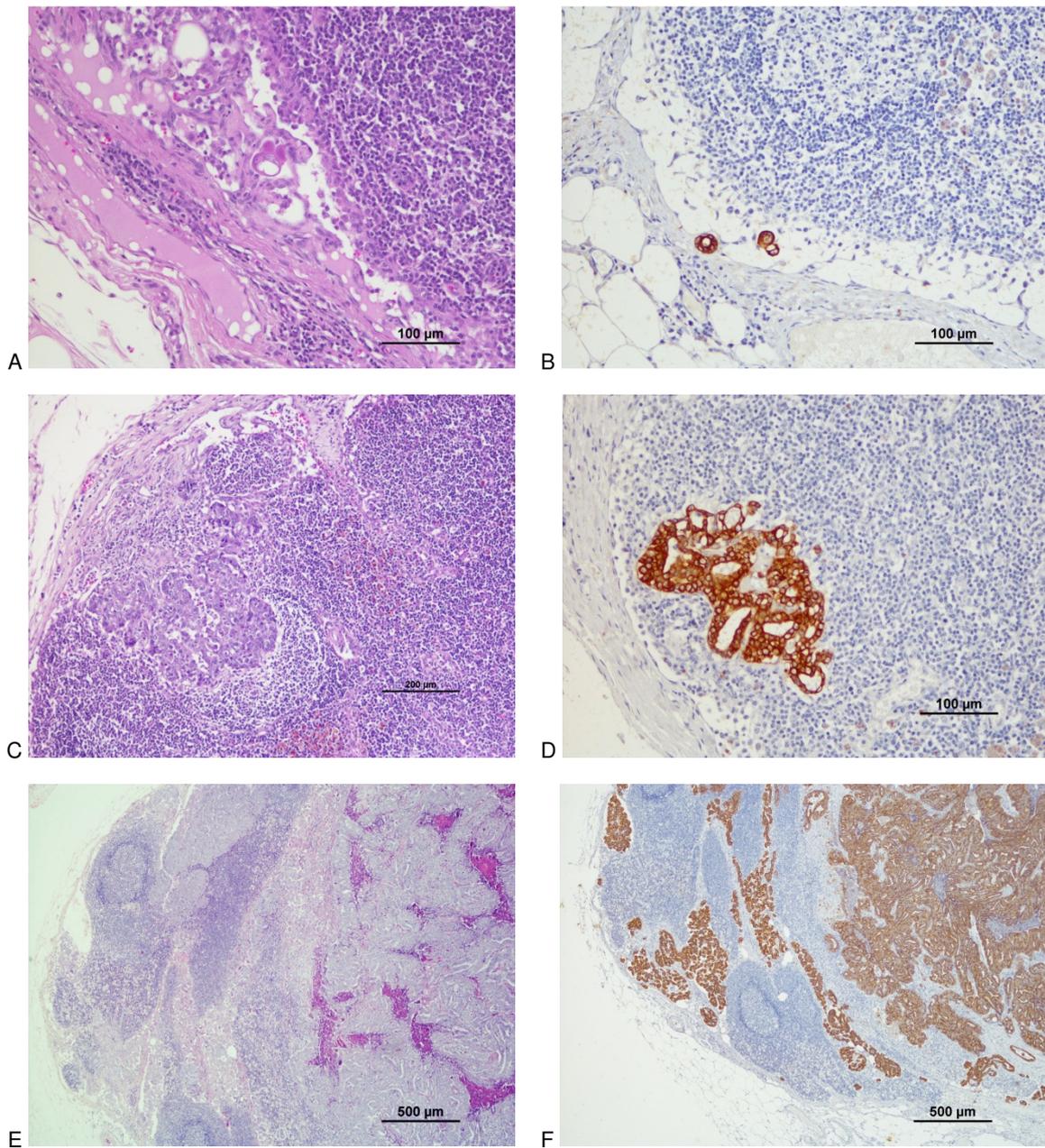


Figura 3. Histopatologia de linfonodos regionais mamários da cadela. A e B: depósitos de células epiteliais neoplásicas isoladas (ITCs) ao nível dos seios subcapsulares, com diâmetro inferior a 0,2 mm (200 μm); C e D: presença de micrometástase a nível do parênquima ganglionar, com diâmetro entre 0,2 mm (200 μm) a 2 mm (2000 μm); E e F: presença de macrometástase a nível do parênquima ganglionar, com tamanho superior a 2 mm (2000 μm). HE: A, C, E; IHQ anti-queratina AE1/AE3: B, D, F.

Não se observaram outras associações estatisticamente significativas entre o envolvimento dos linfonodos (presença/ausência), o tipo de metástases e as restantes características clínicas desta série de carcinomas.

Quadro 9. Associações entre as características clínicas e o tipo de metástases observadas na presente série.

Parâmetro clínico	Ausência de metástases n (%)	ITCs n (%)	Micrometástases n (%)	Macrometástases n (%)	P
Idade (n=63)					
<10 anos	11 (39,3)	5 (17,9)	4 (14,3)	8 (28,6)	0,300
≥10 anos	11 (31,4)	2 (5,7)	9 (25,7)	13 (37,1)	
Raça (n=69)					
Indeterminada	13 (39,4)	3 (9,1)	7 (21,2)	10 (30,3)	0,792
Serra da Estrela	1 (25)	0 (0)	2 (50)	1 (25)	
Caniche	1 (25)	1 (25)	1 (25)	1 (25)	
Cocker spaniel	2 (66,7)	0 (0)	0 (0)	1 (33,3)	
Outras	7 (28)	6 (24)	4 (16)	8 (32)	
Ovarohisterectomia (n=49)					
Não	12 (30,8)	6 (15,4)	7 (17,9)	14 (35,9)	0,814
Sim	4 (40)	2 (20)	2 (20)	2 (20)	
Contraceção (n=21)					
Não	5 (25)	1 (5)	7 (35)	7 (35)	0,636
Sim	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	
Tamanho (n=71)					
<3 cm	12 (54,5)	2 (9,1)	2 (9,1)	6 (27,3)	0,075
3-5 cm	7 (30,4)	2 (8,7)	7 (30,4)	7 (30,4)	
>5 cm	5 (19,2)	7 (26,9)	4 (15,4)	10 (38,5)	
Localização (n=65)					
M1 e M2	2 (40)	2 (40)	0 (0)	1 (20)	0,461
M3	1 (16,7)	2 (33,3)	1 (16,7)	2 (33,3)	
M4 e M5	16 (43,2)	5 (13,5)	8 (21,6)	8 (21,6)	
Múltipla	5 (29,4)	2 (11,8)	2 (11,8)	8 (47,1)	

## IV Resultados

Considerando os principais tipos histológicos, os carcinomas sólidos e os carcinosarcomas demonstraram estar associados a depósitos metastásicos de maiores dimensões (> 2 mm), enquanto que os carcinomas complexos apresentaram taxas significativamente inferiores de metastização regional (P = 0,030).

O grau histológico surgiu associado de forma significativa ao tipo de metástases (P = 0,001), com os tumores indiferenciados (grau III) a apresentarem maior percentagem de macrometástases (n = 20; 55,6%).

A invasão linfovascular esteve significativamente associada à presença de metástases, encontrando-se este parâmetro altamente associado ao aparecimento de macrometástases (P < 0.0001).

Quadro 10. Associações entre os parâmetros histopatológicos e o tipo de metástases observadas na presente série.

Parâmetro histopatológico	Ausência de metástases n (%)	ITCs n (%)	Micrometástases n (%)	Macrometástases n (%)	P
Tipo histológico (n=64)					
C. tubulopapilar	8 (27,6)	9 (31)	5 (17,2)	7 (24,1)	<b>0,030</b>
C. sólido	5 (29,4)	0 (0)	3 (17,6)	9 (52,9)	
C. complexo	7 (58,3)	1 (8,3)	3 (25)	1 (8,3)	
Carcinosarcoma	1 (16,7)	0 (0)	2 (33,3)	3 (50)	
Grau histológico (n=75)					
I	3 (37,5)	3 (37,5)	1 (12,5)	1 (12,5)	<b>0,001</b>
II	14 (45,2)	7 (22,6)	7 (22,6)	3 (9,7)	
III	9 (25)	1 (2,8)	6 (16,7)	20 (55,6)	
Invasão linfovascular (n=75)					
Ausente	21 (53,8)	9 (23,1)	5 (12,8)	4 (10,3)	<b>&lt;0,0001</b>
Presente	5 (13,9)	2 (5,6)	9 (25)	20 (55,6)	

#### 4.2. Análise de sobrevivência

O seguimento clínico pós-cirúrgico foi possível em 48 cadelas, tendo-se verificado a morte de 23 animais durante o período do estudo devido a doença oncológica. Aos 12 meses após excisão cirúrgica, 20 (41,7%) dos animais tinham morrido, verificando-se uma sobrevivência média total de 14,6 meses (mediana = 16 meses). Os Quadro 11 e Quadro 12 apresentam a análise da ST relativamente aos parâmetros clinicopatológicos e à presença de metástases nos linfonodos, respetivamente.

Foram observadas associações estatisticamente significativas entre a ST e o tipo histológico ( $P = 0,02$ ), grau histológico ( $P < 0,0001$ ) e invasão linfovascular ( $P < 0,0001$ ). Quanto ao tipo histológico, os carcinomas sólidos e os carcinosarcomas estiveram associados a taxas de ST mais baixas. Os tumores classificados com grau histológico III e aqueles em que foi detetada invasão linfovascular revelaram períodos médios de ST significativamente inferiores (Figura 4).

Quadro 11. Análise de sobrevivência total relativamente aos parâmetros clinicopatológicos.

Parâmetro	n	Sobrevivência total (ST)		P
		Tempo médio de ST (meses)	ST aos 12 meses n (%)	
Tamanho				
<3 cm	15	14,1	8 (53,3)	0,973
3-5 cm	16	15,1	9 (61,9)	
>5 cm	14	14,9	6 (52,4)	
Tipo histológico				
Carcinoma tubulopapilar	15	19,7	12 (80,0)	0,02
Carcinoma sólido	12	13,3	5 (53,6)	
Carcinosarcoma	4	6,5	0 (0)	
Carcinoma complexo	7	18,89	6 (85,7)	
Grau histológico				
I/II	23	20,3	18 (86,3)	<0,0001
III	25	8,9	4 (25,7)	
Invasão linfovascular				
Ausente	24	19,3	16 (78,2)	<0,0001
Presente	24	9,1	4 (31,0)	

## IV Resultados

No que diz respeito às metástases ganglionares, a sua presença esteve sempre significativamente associada a piores taxas de sobrevivência total (Figura 4). No entanto, caso se categorizem as metástases em ITCs, micrometástases e macrometástases, as diferenças em termos de ST são mais relevantes, mesmo ao considerarmos as ITCs e micrometástases em conjunto ( $P < 0,0001$ ). De facto, as cadelas sem metástase ganglionar ou com ITCs/micrometástases apresentaram taxas de sobrevivência semelhantes, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos (18,7 vs. 17,3 meses,  $P = 0,549$ ).

Quadro 12. Análise da sobrevivência total, considerando diferentes categorias de metastização ganglionar.

Parâmetro	n	Sobrevivência total (ST)		P
		Tempo médio de ST (meses)	ST aos 12 meses n (%)	
Metástase ganglionar (2 cat)				
Ausente	17	18,7	13 (76,5)	<b>0,013</b>
Presente	31	11,6	8 (42,0)	
Tipo de metástase ganglionar (4 cat)				
Ausente	17	18,7	13 (76,5)	<b>&lt;0,0001</b>
ITCs	6	21,5	*	
Micrometástases	10	14,4	6 (68,6)	
Macrometástases	15	5,50	2 (13,3)	
Tipo de metástase ganglionar (3 cat)				
Ausente	17	18,7	13 (76,5)	<b>&lt;0,0001</b>
ITCs/Micrometástases	16	17,3	10 (79,5)	
Macrometástases	15	5,50	2 (13,3)	

\* Não foi possível calcular a sobrevivência cumulativa aos 12 meses devido à existência de casos censurados.

A análise da SLD foi possível em 46 casos, tendo ocorrido recidiva local e/ou metastização em 22 animais. Aos 12 meses após cirurgia, 21 (45,7%) cadelas apresentavam sinais de recorrência e/ou doença metastásica. O tempo médio livre de doença oncológica foi 14,2 meses (mediana = 14 meses).

Foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre a SLD e o tipo histológico ( $P = 0,004$ ), grau histológico ( $P < 0,0001$ ) e invasão linfovascular ( $P = 0,004$ ). As associações entre parâmetros clinicopatológicos e SLD estão discriminadas no Quadro 13.

Quadro 13. Análise de sobrevivência livre de doença relativamente aos parâmetros clinicopatológicos.

Parâmetro	n	Sobrevivência livre de doença (SLD)		P
		Tempo médio de SLD (meses)	SLD aos 12 meses n (%)	
Tamanho				
<3 cm	14	14,5	8 (57,1)	0,62
3-5 cm	15	16,9	10 (66,7)	
>5 cm	14	13,3	5 (43,7)	
Tipo histológico				
Carcinoma tubulopapilar	14	19,2	5 (71,4)	<b>0,004</b>
Carcinoma sólido	11	14,4	5 (58,4)	
Carcinossarcoma	4	4,3	0 (0)	
Carcinoma complexo	7	19,7	5 (71,4)	
Grau histológico				
I/II	22	20,1	13 (73,7)	<b>&lt;0,0001</b>
III	24	8,5	4 (27,5)	
Invasão linfovascular				
Ausente	24	18,1	13 (63,7)	<b>0,004</b>
Presente	22	8,9	5 (35,4)	

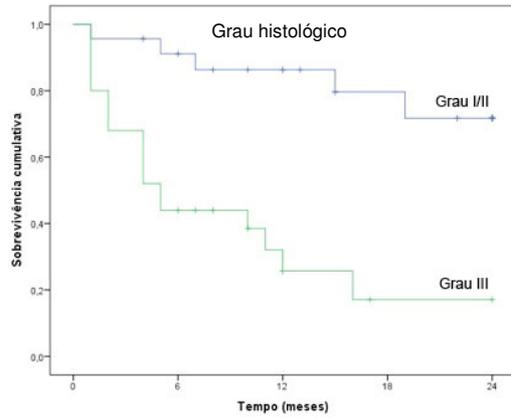
Quanto ao envolvimento dos linfonodos regionais, a presença de metástases também esteve associada a um menor período livre de doença, apesar de apenas se observarem diferenças estatisticamente significativas ao categorizar as metástases (Quadro 14). Analisando o tipo de metástases, cadelas com macrometástases ganglionares apresentaram uma SLD média de 4,9 meses, ao passo que animais sem metastização a nível regional ou com ITCs/micrometástases revelaram um período de remissão cerca de 3 a 4 vezes superior. Tal como verificado para a ST, não se observaram diferenças significativas ao nível da SLD entre o grupo sem metástases e o grupo com ITCs/micrometástases (16,6 vs. 19,5 meses; P = 0,432) (Figura 5).

## IV Resultados

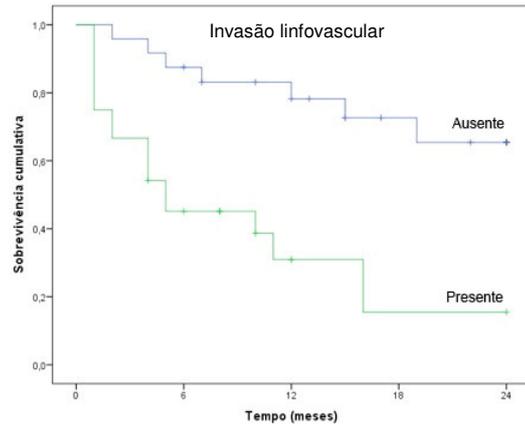
Quadro 14. Análise da sobrevivência livre de doença, considerando diferentes categorias de metastização ganglionar.

Parâmetro	n	Sobrevida livre de doença (SLD)		P
		Tempo médio de SLD (meses)	SLD aos 12 meses n (%)	
Metástase ganglionar (2 cat)				
Ausente	17	16,6	10 (63,7)	0,184
Presente	29	12,7	7 (40,1)	
Tipo de metástase ganglionar (4 cat)				
Ausente	17	16,6	10 (63,7)	<0,0001
ITCs	6	*	*	
Micrometástases	9	*	2 (51,9)	
Macrometástases	14	4,9	2 (14,3)	
Tipo de metástase ganglionar (3 cat)				
Ausente	17	16,6	10 (63,7)	<0,0001
ITCs/Micrometástases	15	19,5	5 (71,8)	
Macrometástases	14	4,9	2 (14,3)	

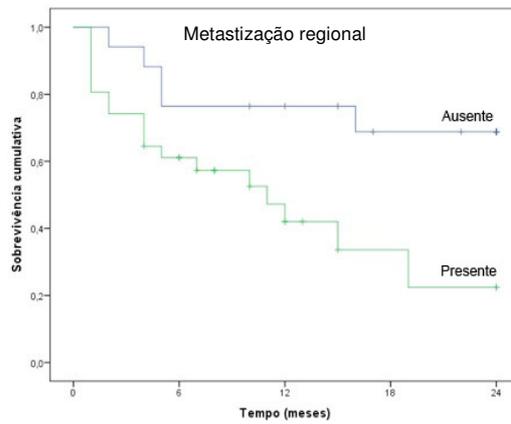
\* Não foi possível calcular o tempo médio de sobrevivência e a sobrevivência cumulativa aos 12 meses devido à existência de casos censurados.



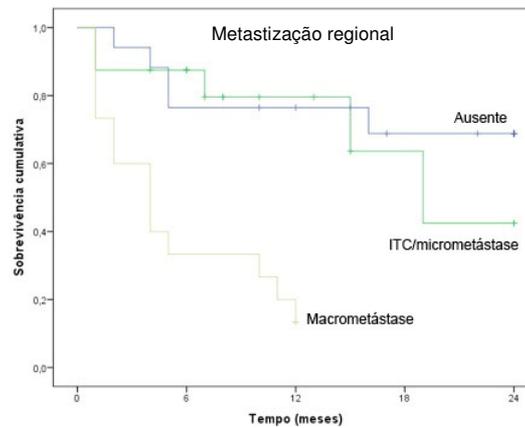
A



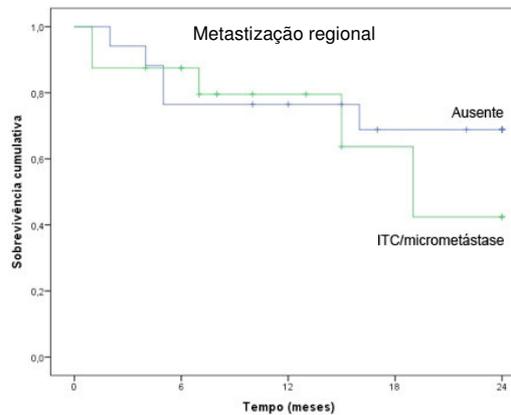
B



C



D



E

Figura 4. Curvas Kaplan-Meier de sobrevivência total (ST). A: grau histológico (grau I/II vs. grau III),  $P < 0,0001$ ; B: invasão linfovacular (presente vs. ausente),  $P < 0,0001$ ; C: metástase ganglionar (ausente vs. presente),  $P = 0,013$ ; D: tipo de metástases (ausente vs. ITCs/micrometástases vs. macrometástases),  $P < 0,0001$ ; E: metástase ganglionar (ausente vs. ITCs/ micrometástases);  $P = 0,549$ .

## IV Resultados

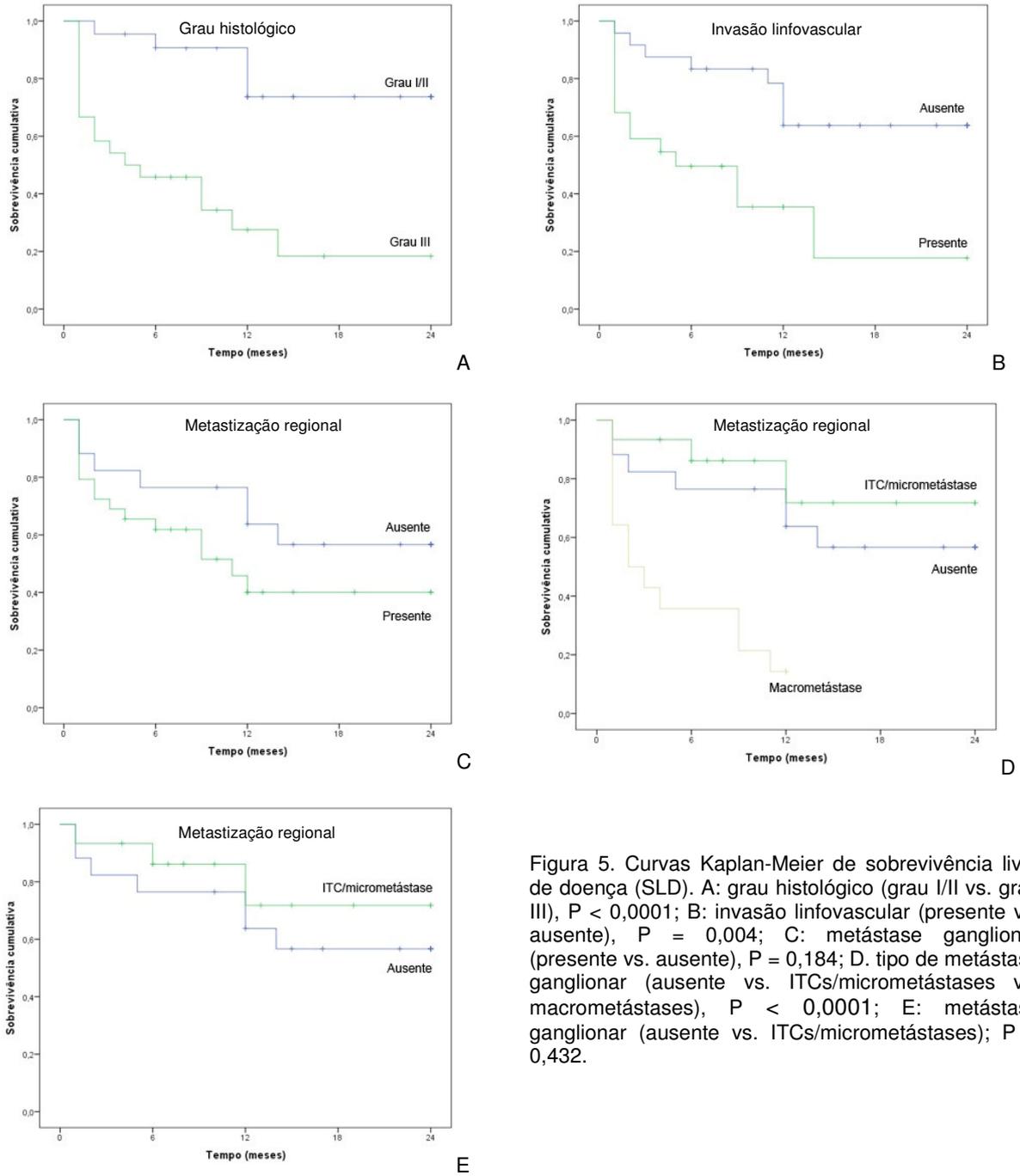


Figura 5. Curvas Kaplan-Meier de sobrevivência livre de doença (SLD). A: grau histológico (grau I/II vs. grau III),  $P < 0,0001$ ; B: invasão linfovascular (presente vs. ausente),  $P = 0,004$ ; C: metástase ganglionar (presente vs. ausente),  $P = 0,184$ ; D: tipo de metástase ganglionar (ausente vs. ITCs/micrometástases vs. macrometástases),  $P < 0,0001$ ; E: metástase ganglionar (ausente vs. ITCs/micrometástases);  $P = 0,432$ .

## Capítulo V

---

Discussão



## V. Discussão

No domínio da oncologia veterinária, os tumores mamários da cadela continuam a constituir um desafio para clínicos e patologistas. A grande diversidade de fenótipos e o seu comportamento heterogêneo exige o apuramento de indicadores clínicos, histológicos e/ou moleculares que permitam prever a evolução do processo neoplásico, ajustar o plano terapêutico ao prognóstico e reduzir as taxas de morbidade e mortalidade relacionadas com estas neoplasias (Sarli et al., 2002; Gama et al., 2008).

O estadiamento clínico e a classificação histopatológica dos tumores mamários caninos fornecem informação relevante acerca do prognóstico e opções terapêuticas (Peña et al., 2013). Neste estudo, caracterizámos uma série de neoplasias malignas da mama da cadela do ponto de vista clinicopatológico e estudámos que informações podiam revelar as variáveis clinicopatológicas relativamente ao comportamento biológico dos tumores mamários malignos e ao prognóstico. Analisou-se, em especial, a influência da metastização dos linfonodos regionais na progressão da doença oncológica, nomeadamente, a relação entre a dimensão dos focos metastásicos dos linfonodos regionais e o prognóstico. Foi também estudada a relação entre a presença de metastização regional e o tipo de metástase com os parâmetros clinicopatológicos.

Vários parâmetros epidemiológicos, clínicos e histopatológicos foram já identificados como indicadores de prognóstico das neoplasias mamárias da cadela (Sorenmo et al., 2011; Peña et al., 2013). Neste estudo, o tipo histológico, o grau histológico, a invasão linfovascular e a metastização regional revelaram valor prognóstico tanto no estudo de sobrevivência livre de doença como de sobrevivência total. Na avaliação da relevância biológica dos parâmetros clinicopatológicos considerámos tanto o período médio de sobrevivência até à recidiva local e/ou metastização à distância, como o tempo médio desde a mastectomia até à morte devida a doença oncológica.

A média das idades dos animais em estudo foi de 10 anos, um valor semelhante ao observado noutros estudos retrospectivos (Hellmén et al., 1993; Yamagami et al., 1996; Sarli et al., 2002; Gama et al., 2010; Santos et al., 2013; Rasotto et al., 2017; Coletto et al., 2018). Alguns autores apontaram a idade como uma variável associada a um pior prognóstico, observando-se em animais de idade mais avançada a presença de tumores com comportamento mais agressivo (Schneider et al., 1969; Hellmén et al., 1993; Pérez Alenza et al., 1997; Philibert et al., 2003; Sorenmo et al., 2009; Peña et al., 2013; Im et al., 2014; Canadas et al., 2018). Contudo, noutros estudos, a idade não surgiu como um bom fator de

prognóstico (Shofer et al., 1989; Chang et al., 2005; Philibert et al., 2003; Rasotto et al., 2017).

Sorenmo e colaboradores (2009) sugeriram que a progressão maligna é um processo contínuo a partir de lesões benignas e relacionado com a taxa de crescimento tumoral. Alguns estudos têm investigado a relevância das dimensões da neoplasia como indicador de prognóstico mas a categorização do tamanho varia entre estudos, dificultando a comparação dos resultados obtidos (Matos et al., 2012). No entanto, a maioria dos estudos corrobora que os tumores de menores dimensões têm um melhor prognóstico que os de maiores dimensões (Yamagami et al., 1996; Philibert et al., 2003; Chang et al., 2005; Peña et al., 2013; Santos et al., 2013; Gunnes et al., 2017; Rasotto et al., 2017). Neste estudo, os animais foram agrupados de acordo com as categorias T do sistema de estadiamento clínico da OMS (Owen et al., 1980) em: T<sub>1</sub>, tumores < 3 cm; T<sub>2</sub>, tumores 3-5 cm; T<sub>3</sub>, > 5 cm. Verificou-se uma distribuição uniforme entre categorias, ao contrário do que têm observado outros autores, em que a categoria T<sub>1</sub> está sobrerrepresentada (Peña et al., 2013; Santos et al., 2015). Não se observou associação estatisticamente significativa entre as categorias T da OMS e a ST e SLD, corroborando os resultados de Karayannopoulou et al. (2005) que não encontraram relação entre o tamanho tumoral e o prognóstico. Shofer et al. (1989) e Hellmén et al. (1993), categorizando as dimensões dos tumores noutros intervalos, também não encontraram importância prognóstica neste parâmetro. Em oposição, Pérez Alenza et al. (1997) e Peña et al. (2013) confirmaram, em análise univariada, o valor prognóstico das categorias propostas pela OMS para as dimensões tumorais. A categorização dos tumores em < 1 cm, 1 – 2,9 cm e ≥ 3 cm também esteve relacionado com a sobrevivência total (Peña et al., 2013). Noutros trabalhos, verificou-se que os tumores < 3 cm estavam associados a menor risco de recidiva local ou metástases à distância (Kurzman e Gilbertson, 1986; Santos et al., 2013; Santos et al., 2015) e ao aumento significativo do tempo de sobrevivência (Philibert et al., 2003; Santos et al., 2013; Santos et al., 2015). Em sentido oposto, Yamagami et al. (1996) e Chang et al. (2005) reportaram que cadelas com tumores mamários ≥ 5 cm têm um risco significativamente superior de morte após mastectomia, não existindo diferenças significativas entre as categorias T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub> (Yamagami et al., 1996). O tamanho tumoral surgiu como um fator de prognóstico independente no estudo de Rasotto e colaboradores (2017): os animais com tumores de dimensão inferior a 1 cm revelaram um risco significativamente inferior de recidiva local, metástases à distância e de morte relacionada com o tumor, em comparação com tumores com 1 – 2 cm, 2 – 5 cm e superiores a 5 cm; em contrapartida, os tumores com diâmetro superior a 5 cm estavam significativamente associados a um pior prognóstico (Rasotto et al., 2017).

O diagnóstico histológico dos carcinomas mamários foi realizado de acordo com o sistema de classificação proposto por Goldschmidt e colaboradores (2011). Esta nova classificação histológica reclassificou e incorporou novos subtipos ao sistema da OMS (Misdorp et al., 1971, 1972, 1973; Hampe e Misdorp, 1974; Misdorp et al., 1999). Após a sua publicação, vários estudos demonstraram o seu valor prognóstico (Peña et al., 2013; Im et al., 2014; Rasotto et al., 2017; Canadas et al., 2018). Neste estudo, devido ao escasso número de amostras de determinados subtipos histológicos, apenas foram comparados os diagnósticos histológicos mais frequentes. Os carcinosarcomas revelaram pior prognóstico que os carcinomas sólidos e estes uma evolução mais agressiva que os carcinomas tubulopapilares, em concordância com a literatura consultada (Bostock, 1975; Misdorp e Hart, 1976; Chang et al., 2005; Peña et al., 2013; Santos et al., 2013; de Araújo et al., 2015; Santos et al., 2015; Rasotto et al., 2017; Canadas et al., 2018). A análise de sobrevivência revelou um menor risco de recidiva local, metástases à distância e morte em cadelas com carcinomas complexos, comparando com os tipos histológicos anteriores, o que já tinha sido descrito por outros autores (Misdorp e Hart, 1976; Yamagami et al., 1996; Peña et al., 2013; Rasotto et al., 2017). Foi sugerido que o comportamento menos agressivo dos carcinomas complexos está relacionado com o efeito protetor da proliferação de células mioepiteliais bem diferenciadas durante a histogénese destas neoplasias (Peña et al., 2014; Rasotto et al., 2014; Goldschmidt et al., 2016; Sánchez-Céspedes et al., 2016).

Quanto ao grau histológico, os carcinomas de grau III apresentaram uma ST e uma SLD significativamente inferior à dos carcinomas grau I/II, revelando uma forte relação entre este parâmetro e o prognóstico. Estes resultados corroboram estudos anteriores (Karayannopoulou et al., 2005; Peña et al., 2013; Santos et al., 2015; Rasotto et al., 2017).

A progressão maligna dos carcinomas está relacionada com a sua capacidade de invasão e metastização. A disseminação das células neoplásicas desde o tumor primário até um local à distância envolve múltiplos eventos (Hanahan e Weinberg, 2011; Cullen e Breen, 2016). Os carcinomas mamários da cadela disseminam-se preferencialmente por via linfática e atingem os linfonodos regionais (Sorenmo, 2003) em aproximadamente 50% dos casos (Misdorp e Hart, 1976; Chang et al., 2005). Nesta série de carcinomas, 64% dos animais tinham evidências de metastização regional na avaliação histopatológica, uma taxa também observada por de Araújo et al. (2015). Os linfonodos axilares podem estar envolvidos no processo neoplásico, quando se trata de neofomações nas glândulas mamárias M1, M2 e M3, ao passo que o linfocentro inguinfemural é geralmente o local de metastização das neoplasias localizadas em M3, M4 e M5. Contudo, outros linfonodos podem estar implicados devido a alterações no padrão de drenagem linfática que podem ocorrer em glândulas mamárias neoplásicas (Pereira et al., 2003; Patsikas et al., 2006).

Biologicamente, a presença de êmbolos neoplásicos em vasos na periferia do tumor indica a natureza maligna do processo neoplásico, ainda que as células neoplásicas tenham de ser capazes de se estabelecer como uma massa viável num novo local, após disseminação sanguínea ou linfática (Cullen e Breen, 2016). À semelhança do verificado por outros autores (Gilbertson et al., 1983; Yamagami et al., 1996; Rasotto et al., 2012; Santos et al., 2015; Diessler et al., 2017; Rasotto et al., 2017; Canadas et al., 2018), a invasão linfovascular esteve significativamente associada a um maior risco de recidiva local e metástases à distância e revelou um forte impacto na sobrevivência total.

A presença de metastização nos linfonodos regionais é considerada um importante indicador de prognóstico das neoplasias mamárias caninas, estando associada a um pior prognóstico, com aumento das taxas de recidiva local e metastização à distância e diminuição do tempo de sobrevivência (Kurzman e Gilbertson, 1986; Hellmén et al., 1993; Yamagami et al., 1996; Pérez Alenza et al., 1997; Chang et al., 2005; Karayannopoulou et al., 2005; Szczubial e Lopuszynski, 2011; Peña et al., 2013; Santos et al., 2013; de Araújo et al., 2015; Diessler et al., 2017). No entanto, alguns estudos não verificaram esta relação entre o estado dos linfonodos regionais e a progressão da doença neoplásica após excisão tumoral (Misdorp e Hart, 1976; Shofer et al., 1989). Em concordância com a maioria dos autores, confirmou-se neste trabalho que o envolvimento dos linfonodos regionais é um bom indicador de prognóstico. A análise das curvas de sobrevivência revelou uma diminuição do tempo médio de ST nos animais com metástases nos linfonodos regionais, assim como uma redução do tempo médio de SLD nas cadelas com linfonodos positivos, em relação ao grupo de animais sem metástases. No entanto, não se encontrou uma associação estatisticamente significativa entre a SLD e o envolvimento regional.

Nos tumores de mama da mulher, o envolvimento do linfonodo axilar no processo neoplásico também é um importante fator de prognóstico, estando relacionado com a capacidade de disseminação do tumor (Cserni, 2005; Tsuda, 2015). A avaliação dos linfonodos regionais é um procedimento fundamental para fazer o estadiamento tumoral e, assim, definir o plano terapêutico e estabelecer o prognóstico. A determinação da categoria pN, segundo a classificação AJCC/UICC, considera a presença de metástases nos linfonodos, o número de linfonodos positivos e a dimensão dos focos metastásicos (Amin et al., 2016; Brierley et al., 2017). As metástases regionais são categorizadas em ITCs, micrometástases e macrometástases, de acordo com a dimensão do maior depósito metastásico detetado. Contudo, o significado clínico dos achados nos linfonodos regionais não está completamente esclarecido, designadamente o da identificação de metástases ocultas (micrometástases e ITCs) por IHQ (Cserni, 2005; Cserni et al., 2006; Weaver et al., 2011; Tsuda, 2015; Naidoo e Pinder, 2017). Alguns estudos reportaram que a deteção de

metástases ocultas a nível regional tinha valor prognóstico em pacientes com cancro da mama (Cote et al., 1999; Alberti et al., 2006; de Boer et al., 2009; de Boer et al., 2010; Weaver et al., 2011; Andersson et al., 2018), enquanto outros não encontraram essa associação (Nasser et al., 1993; Kahn et al., 2006; Hansen et al., 2009; Reed et al., 2009; Gobardhan et al., 2011; Maaskant-Braat et al., 2011; Rovera et al., 2013; Ahmed et al., 2014; Houvenaeghel et al., 2014). Por outro lado, alguns autores reportam que apenas as micrometástases estão associadas a um pior prognóstico (International (Ludwig) Breast Cancer Study Group, 1990; Nasser et al., 1993; Susnik et al., 2004; Cox et al., 2008; Salhab et al., 2011; Kimbrough et al., 2015). De realçar que na mulher os linfonodos com metástases de dimensão igual ou inferior a 0,2 mm (ITCs) são considerados negativos ( $N_0$ ) (Amin et al., 2016; Brierley et al., 2017). Em Medicina Veterinária, os sistemas de estadiamento tumoral classificam como positivo ( $N_1$ ) qualquer evidência da presença de células neoplásicas nos linfonodos regionais (Owen et al., 1980; Rutteman et al., 2001; Goldschmidt et al., 2016).

Recentemente tem sido questionada a importância da dimensão dos focos metastásicos nos linfonodos regionais adjacentes a carcinomas mamários na cadela. Nesse sentido, realizaram-se alguns estudos que procuraram esclarecer acerca do valor prognóstico das ITCs, micrometástases e macrometástases. Os resultados obtidos não foram consensuais. Szczubial e Lopuszynski (2011), num estudo que envolveu 51 cadelas com carcinomas mamários, compararam as diferenças em termos de SLD e ST entre cadelas sem células neoplásicas nos linfonodos regionais, cadelas com micrometástases (0,2-2 mm) e cadelas com macrometástases (> 2 mm). Concluíram que apenas metástases maiores de 2 mm (macrometástases) nos linfonodos regionais têm valor prognóstico (Szczubial e Lopuszynski, 2011). No presente estudo obtivemos resultados idênticos, apesar de no trabalho de Szczubial e Lopuszynski (2011) não se terem incluído casos com ITCs. Na presente série, a presença de metástases nos linfonodos regionais esteve significativamente associada a uma redução da sobrevivência total. Após confirmação do envolvimento regional por imuno-histoquímica e aplicando os critérios da classificação pN dos tumores da mama da mulher, 49% dos casos positivos apresentaram macrometástases, 28,6% micrometástases e 22,4 % ITCs. A análise de sobrevivência revelou que os animais com macrometástases (> 2 mm) apresentaram um tempo médio de sobrevivência total e livre de doença cerca de 3 vezes inferior, em comparação com os animais sem metástases regionais, com ITCs ou micrometástases. Após um ano de seguimento clínico, apenas 13,3% das cadelas com macrometástases estavam vivas, em oposição a taxas de sobrevivência superiores a 75% nos grupos dos animais com ITCs/micrometástases e sem metástases. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os

grupos de animais sem metástases regionais ou com ITCs/micrometástases. Coletto et al. (2018) compararam a sobrevivência total de animais com ITCs e animais sem metástases e também não encontraram diferenças estatisticamente significativas entre estes dois grupos. Contrariamente às evidências observadas neste e em outros estudos (Szcubial e Lopuszynski, 2011; Coletto et al., 2018), de Araújo et al. (2015) apontaram a relevância das ITCs, mas não das micrometástases, na progressão dos carcinomas mamários. Nesse estudo, verificou-se que os grupos de animais com ITCs, com metástases não mensuráveis e com macrometástases tinham períodos de sobrevivência significativamente inferiores aos grupos de animais sem metástases ou com micrometástases (de Araújo et al., 2015). Os autores reportaram que 33,3% dos linfonodos regionais com ITCs foram observados em cadelas com carcinomas mais agressivos (carcinosarcomas e carcinomas sólidos), sugerindo uma relação entre o significado prognóstico das ITCs e o tipo histológico dos carcinomas (de Araújo et al., 2015). Na nossa amostra, detetou-se um caso de ITCs associado a um carcinoma de células escamosas, indiferenciado, enquanto os restantes 10 casos de ITCs foram observados em carcinomas tubulopapilares e complexos de grau I/II.

A demonstração do significado prognóstico do número de linfonodos metastizados em mulheres com tumores mamários (Fisher et al., 1983) conduziu à inclusão deste parâmetro nos critérios pN da classificação AJCC/UICC (Amin et al., 2016; Brierley et al., 2017). No mesmo sentido, de Araújo et al. (2015) concluiu que a identificação de mais do que um linfonodo regional ipsilateral metastizado está associada a um pior prognóstico. Neste estudo, não foi efetuada essa análise, mas consideramos importante essa avaliação futura numa amostra de casos mais ampla.

Na literatura consultada há evidências que algumas características do tumor podem prever a capacidade de invasão e metastização das neoplasias mamárias tanto na mulher (Chen et al., 2002; Tan et al., 2005; Madsen et al., 2013), como na cadela (Rasotto et al., 2012). A investigação destes parâmetros permite identificar indivíduos em risco e, assim, adotar medidas terapêuticas preventivas. Neste estudo, a dimensão do tumor surgiu associada à presença de metastização regional, corroborando os resultados obtidos por Chang et al. (2005). As cadelas com tumores de dimensão superior a 5 cm apresentaram maior risco de metastização nos linfonodos regionais; apesar disso, 21,3% dos casos com linfonodos positivos foram observados em animais com tumores com dimensão inferior a 3 cm, contrariamente a Chang et al. (2005) que não detectaram linfonodos positivos em animais com tumores de dimensão inferior a 3 cm. Considerando as categorias das metástases regionais estudadas, não se encontrou uma associação significativa entre estas categorias e a dimensão do tumor primário. No entanto, a frequência mais elevada de macrometástases ocorreu nas cadelas com tumores de dimensão superior a 5 cm. Madsen et al. (2013), numa

análise multivariada, observou um risco superior de micrometástases e macrometástases em mulheres com tumores mamários de maiores dimensões. Os nossos resultados não revelaram outras associações entre as características clínicas e a presença de metástases ou o tipo de metástases regionais. O tipo histológico (Szczubial e Lopuszynski, 2011; Rasotto et al., 2012; Im et al., 2014) e o grau histológico (Rasotto et al., 2012; Diessler et al., 2017) são bons indicadores da capacidade dos carcinomas metastizarem nos linfonodos regionais. A avaliação da relação entre a dimensão dos focos metastásicos e o tipo e grau histológicos, revelou que a deteção de metástases superiores a 2 mm esteve significativamente associada à presença de carcinoma sólido ou carcinosarcoma e a neoplasias mais indiferenciadas, de comportamento potencialmente mais agressivo. Os carcinosarcomas revelaram o maior potencial metastásico, com mais de 80% dos casos a apresentarem metástases nos linfonodos regionais, sendo que 50% eram macrometástases. As taxas mais baixas (41,6%) de metastização regional foram observadas nos carcinomas complexos; de notar que se consideraram para a análise estatística apenas os tipos histológicos mais frequentes. A invasão linfovascular foi identificada como um parâmetro fortemente associado à metastização dos linfonodos regionais, tanto na análise univariada (Araújo et al., 2016) como multivariada (Diessler et al., 2017). À semelhança destes resultados, também encontramos uma associação significativa entre a presença de êmbolos neoplásicos e a dimensão dos focos metastásicos. No entanto, em cerca de 10% dos casos em que não se observou invasão linfovascular foram detetadas macrometástases, o que estará provavelmente associado ao facto dos tumores primários serem de dimensão considerável e ser analisada uma amostra que pode não exibir áreas de invasão. Por outro lado, este resultado realça a importância da avaliação dos linfonodos regionais.

A imuno-histoquímica revelou-se uma ferramenta bastante útil na confirmação e identificação de ITCs nos linfonodos, apesar de nesta série apenas se ter detetado uma metástase oculta. Provavelmente, deveu-se ao facto de se terem efetuado múltiplas secções dos linfonodos, com intervalos de cerca de 2 mm, mesmo quando não se observou alteração macroscópica indicativa de metástase.

Os estudos que avaliaram o significado prognóstico da presença de macrometástases, micrometástases e ITCs em linfonodos regionais de cadelas com carcinomas mamários, ainda são escassos e envolveram amostras de pequena dimensão. Os resultados do presente estudo sugerem que os depósitos metastásicos com dimensão superior a 2 mm nos linfonodos regionais são um importante indicador de prognóstico enquanto a deteção de ITCs e micrometástases não parece estar associada a piores taxas de sobrevivência. No entanto, estas conclusões carecem de confirmação em estudos de maior escala, que incluam maior número de casos com ITCs e micrometástases e que permitam a

comparação crítica entre as diferentes categorias. Por outro lado, estes resultados enfatizam a necessidade de rever a classificação TNM para as neoplasias mamárias caninas, uma vez que atualmente o envolvimento do linfonodo é apenas classificado em  $N_0$  (sem evidência de metástase) e  $N_1$  (com evidência de metástase, incluindo ITCs).

## **Capítulo VI**

---

Conclusões



## VI. Conclusões

Neste estudo, procurámos esclarecer acerca da importância clínica e prognóstica da identificação do tipo de metástases presentes nos linfonodos regionais de cadelas com neoplasia mamária maligna. Salientamos as seguintes conclusões:

- a presença de metástases nos linfonodos regionais de cadelas com neoplasias mamárias malignas esteve significativamente associada a pior prognóstico, sendo as diferenças mais relevantes após categorização dos depósitos metastásicos;
- a presença de metástases de diâmetro inferior a 2 mm (ITCs e micrometástases) nos linfonodos regionais de cadelas com neoplasias mamárias malignas não esteve associada a pior prognóstico; efetivamente, apenas a deteção de macrometástases (depósitos metastásicos superiores a 2 mm) esteve significativamente associada a piores taxas de sobrevivência;
- a comparação das curvas de sobrevivência de cadelas com ITCs/micrometástases e de cadelas sem envolvimento regional não revelou diferenças significativas tanto relativamente à ST como à SLD;
- a técnica de imunohistoquímica anti-queratinas revelou-se uma ferramenta útil na deteção de ITCs/micrometástases nos linfonodos, apesar de nesta série se ter identificado apenas uma metástase oculta;
- a análise estatística da relação entre os parâmetros clinicopatológicos e o tipo de metástases revelou que o tipo histológico, o grau histológico e a invasão linfovascular estão associados ao tipo de metástases, estando a presença de macrometástases nos linfonodos regionais associada a parâmetros de maior agressividade biológica;
- consideramos necessários estudos adicionais, com um maior número de animais, que comprovem estes resultados e conclusões.



## **Capítulo VII**

---

Referências bibliográficas



## VII. Referências Bibliográficas

- Ahmed, S. S., Thike, A. A., Iqbal, J., Yong, W. S., Tan, B., Madhukumar, P., ... Tan, P. H. (2014). Sentinel lymph nodes with isolated tumour cells and micrometastases in breast cancer: clinical relevance and prognostic significance. *Journal of Clinical Pathology*, *67*(3), 243–250.
- Alberti, S., Querzoli, P., Pedriali, M., Rinaldi, R., Biganzoli, E., Boracchi, P., ... Nenci, I. (2006). Axillary lymph node nanometastases are prognostic factors for metastatic relapse in breast cancer patients. *Journal of Clinical Oncology*, *24*(18), 610–610.
- Alenza, D. P., Rutteman, G. R., Peña, L., Beynen, A. C., & Cuesta, P. (1998). Relation between Habitual Diet and Canine Mammary Tumors in a Case-Control Study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *12*(3), 132–139.
- Amin, M. B., Edge, S. B., Greene, F. L., Byrd, D. R., Brookland, R. K., Washington, M. K., ... Meyer, L. R. (Eds.). (2016). Breast. In *AJCC Cancer Staging Manual* (8th ed.). New York, NY: Springer, pp. 221–240.
- Andersson, Y., Bergkvist, L., Frisell, J., & de Boniface, J. (2018). Long-term breast cancer survival in relation to the metastatic tumor burden in axillary lymph nodes. *Breast Cancer Research and Treatment*, *171*(2), 359–369.
- Araújo, M. R., Campos, L. C., Damasceno, K. A., Gamba, C. O., Ferreira, E., & Cassali, G. D. (2016). HER-2, EGFR, Cox-2 and Ki67 expression in lymph node metastasis of canine mammary carcinomas: Association with clinical-pathological parameters and overall survival. *Research in Veterinary Science*, *106*, 121–130.
- Benjamin, S. A., Lee, A. C., & Saunders, W. J. (1999). Classification and Behavior of Canine Mammary Epithelial Neoplasms Based on Life-span Observations in Beagles. *Veterinary Pathology*, *36*(5), 423–436.
- Bostock, D. E. (1975). The prognosis following the surgical excision of canine mammary neoplasms. *European Journal of Cancer*, *11*(6), 389–396.
- Brierley, J. D., Gospodarowicz, M. K., & Wittekind, C. (Eds.). (2017). Breast Tumours. In *TNM Classification of Malignant Tumours* (8th ed.). Chichester, West Sussex, UK; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, pp. 152–159.
- Brønden, L. B., Flagstad, A., & Kristensen, A. T. (2007). Veterinary cancer registries in companion animal cancer: a review. *Veterinary and Comparative Oncology*, *5*(3), 133–144.
- Brønden, L. B., Nielsen, S. S., Toft, N., & Kristensen, A. T. (2010). Data from the Danish Veterinary Cancer Registry on the occurrence and distribution of neoplasms in dogs in Denmark. *Veterinary Record*, *166*(19), 586–590.
- Canadas, A., França, M., Pereira, C., Vilaça, R., Vilhena, H., Tinoco, F., ... Santos, M. (2018). Canine Mammary Tumors: Comparison of Classification and Grading Methods in a Survival Study. *Veterinary Pathology*.
- Casey, K. M., Steffey, M. A., & Affolter, V. K. (2016). Identification of occult micrometastases and isolated tumour cells within regional lymph nodes of previously diagnosed non-

## VII Referências Bibliográficas

- metastatic (stage 0) canine carcinomas. *Veterinary and Comparative Oncology*, 15(3), 1-8.
- Chang, S.-C., Chang, C.-C., Chang, T.-J., & Wong, M.-L. (2005). Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 227(10), 1625–1629.
- Chen, M., Palleschi, S., Khoynzhad, A., Gecelter, G., Marini, C. P., & Simms, H. H. (2002). Role of Primary Breast Cancer Characteristics in Predicting Positive Sentinel Lymph Node Biopsy Results: A Multivariate Analysis. *Archives of Surgery*, 137(5), 606–610.
- Coletto, A. F., Wilson, T. M., Soares, N. P., Gundim, L. F., Castro, I. P., Guimarães, E. C., ... Medeiros-Ronchi, A. A. (2018). Prognostic Value of Occult Isolated Tumour Cells within Regional Lymph Nodes of Dogs with Malignant Mammary Tumours. *Journal of Comparative Pathology*, 158, 32–38.
- Cote, R., Fpeterston, H., Chaiwun, B., Gelber, R., Goldhirsch, A., Castiglione-Gertsch, M., ... Neville, A. (1999). Role of immunohistochemical detection of lymph-node metastases in management of breast cancer. *The Lancet*, 354(9182), 896–900.
- Cox, C. E., Kiluk, J. V., Riker, A. I., Cox, J. M., Allred, N., Ramos, D. C., ... Boulware, D. (2008). Significance of sentinel lymph node micrometastases in human breast cancer. *Journal of the American College of Surgeons*, 206(2), 261–268.
- Cserni, G. (2005). Evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer. *Histopathology*, 46(6), 697–702.
- Cserni, G., Bianchi, S., Vezzosi, V., Peterse, H., Sapino, A., Arisio, R., ... Iturriagagoitia, A. C. (2006). The value of cytokeratin immunohistochemistry in the evaluation of axillary sentinel lymph nodes in patients with lobular breast carcinoma. *Journal of Clinical Pathology*, 59(5), 518–522.
- Cullen, J. M., & Breen, M. (2016). An Overview of Molecular Cancer Pathogenesis, Prognosis, and Diagnosis. In D. J. Meuten (Ed.), *Tumors in Domestic Animals* (5th ed.). Ames, Iowa: John Wiley & Sons, Inc, pp. 1–26.
- de Araújo, M. R., Campos, L. C., Ferreira, E., & Cassali, G. D. (2015). Quantitation of the Regional Lymph Node Metastatic Burden and Prognosis in Malignant Mammary Tumors of Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29(5), 1360–1367.
- de Boer, M., Dijck, V., M, J. a. A., Bult, P., Borm, G. F., & Tjan-Heijnen, V. C. G. (2010). Breast Cancer Prognosis and Occult Lymph Node Metastases, Isolated Tumor Cells, and Micrometastases. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 102(6), 410–425.
- de Boer, M., van Deurzen, C. H. M., van Dijck, J. A. A. M., Borm, G. F., van Diest, P. J., Adang, E. M. M., ... Tjan-Heijnen, V. C. G. (2009). Micrometastases or Isolated Tumor Cells and the Outcome of Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 361(7), 653–663.
- Diessler, M. E., Castellano, M. C., Portiansky, E. L., Burns, S., & Idiart, J. R. (2017). Canine mammary carcinomas: influence of histological grade, vascular invasion, proliferation,

- microvessel density and VEGFR2 expression on lymph node status and survival time. *Veterinary and Comparative Oncology*, 15(2), 450–461.
- Dobson, J. M., Samuel, S., Milstein, H., Rogers, K., & Wood, J. L. N. (2002). Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 43(6), 240–246.
- Dorn, C. R., Taylor, D. O., Schneider, R., Hibbard, H. H., & Klauber, M. R. (1968). Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *Journal of the National Cancer Institute*, 40(2), 307–318.
- Dyce, K. M., Sack, W. O., & Wensing, C. J. G. (2010). The Common Integument. In *Textbook of Veterinary Anatomy* (4th ed.). St. Louis, Missouri: Elsevier Science Health Science Division, pp. 355–373.
- Egenvall, A., Bonnett, B. N., Öhagen, P., Olson, P., Hedhammar, Å., & Euler, H. von. (2005). Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Preventive Veterinary Medicine*, 69(1–2), 109–127.
- Elston, C. W., & Ellis, I. O. (1991). pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 19(5), 403–410.
- Elston, C. W., & Ellis, I. O. (1998). Assessment of histological grade. In C. W. Elston & I. O. Ellis (Eds.), *Systemic Pathology - The Breast* (3rd ed., Vol. 13). London: Churchill and Livingstone, pp. 365–384.
- Evans, H. E., & Lahunta, A. de. (2012). The Urogenital System. In *Miller's Anatomy of the Dog* (4th ed.). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders, pp. 361–405.
- Fisher, B., Bauer, M., Wickerham, D. L., Redmond, C. K., Fisher, E. R., Cruz, A. B., ... Volk, H. (1983). Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. *Cancer*, 52(9), 1551–1557.
- Fowler, E. H., Wilson, G. P., & Koestner, A. (1974). Biologic Behavior of Canine Mammary Neoplasms Based on a Histogenetic Classification. *Veterinary Pathology*, 11(3), 212–229.
- Frank, D. W., Kirton, K. T., Murchison, T. E., Quinlan, W. J., Coleman, M. E., Gilbertson, T. J., ... Kimball, F. A. (1979). Mammary tumors and serum hormones in the bitch treated with medroxyprogesterone acetate or progesterone for four years. *Fertility and Sterility*, 31(3), 340–346.
- Gama, A., Alves, A., & Schmitt, F. (2008). Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Archiv*, 453(2), 123–132.
- Gama, A., Gärtner, F., Alves, A., & Schmitt, F. (2009). Immunohistochemical expression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) in canine mammary tissues. *Research in Veterinary Science*, 87(3), 432–437.

## VII Referências Bibliográficas

- Gama, A. (2011). A novel myoepithelial cell marker in canine mammary tissue. *The Veterinary Journal*, 190(3), 303–304.
- Gama, A., Alves, A., & Schmitt, F. (2010). Expression and prognostic significance of CK19 in canine malignant mammary tumours. *The Veterinary Journal*, 184(1), 45–51.
- Gama, A., Paredes, J., Gärtner, F., Alves, A., & Schmitt, F. (2008). Expression of E-cadherin, P-cadherin and  $\beta$ -catenin in canine malignant mammary tumours in relation to clinicopathological parameters, proliferation and survival. *The Veterinary Journal*, 177(1), 45–53.
- Gama, A., & Schmitt, F. (2012). Cadherin cell adhesion system in canine mammary cancer: a review. *Veterinary Medicine International*, 2012, 1–8.
- Gamlem, H., Nordstoga, K., & Glattre, E. (2008). Canine neoplasia – Introductory paper. *APMIS*, 116, 5–18.
- Gilbertson, S. R., Kurzman, I. D., Zachrau, R. E., Hurvitz, A. I., & Black, M. M. (1983). Canine Mammary Epithelial Neoplasms: Biologic Implications of Morphologic Characteristics Assessed in 232 Dogs. *Veterinary Pathology*, 20(2), 127–142.
- Gobardhan, P. D., Elias, S. G., Madsen, E. V. E., van Wely, B., van den Wildenberg, F., Theunissen, E. B. M., ... van Dalen, T. (2011). Prognostic Value of Lymph Node Micrometastases in Breast Cancer: A Multicenter Cohort Study. *Annals of Surgical Oncology*, 18(6), 1657–1664.
- Goldschmidt, M. H., Peña, L., & Zappulli, V. (2016). Tumors of the Mammary Gland. In D. J. Meuten (Ed.), *Tumors in Domestic Animals* (5th ed.). Ames, Iowa: John Wiley & Sons, Inc, pp. 723–765.
- Goldschmidt, M., Peña, L., Rasotto, R., & Zappulli, V. (2011). Classification and Grading of Canine Mammary Tumors. *Veterinary Pathology*, 48(1), 117–131.
- Grüntzig, K., Graf, R., Boo, G., Guscetti, F., Hässig, M., Axhausen, K. W., ... Pospischil, A. (2016). Swiss Canine Cancer Registry 1955–2008: Occurrence of the Most Common Tumour Diagnoses and Influence of Age, Breed, Body Size, Sex and Neutering Status on Tumour Development. *Journal of Comparative Pathology*, 155(2), 156–170.
- Grüntzig, K., Graf, R., Hässig, M., Welle, M., Meier, D., Lott, G., ... Pospischil, A. (2015). The Swiss Canine Cancer Registry: A Retrospective Study on the Occurrence of Tumours in Dogs in Switzerland from 1955 to 2008. *Journal of Comparative Pathology*, 152(2), 161–171.
- Gunnes, G., Borge, K. S., & Lingaas, F. (2017). A statistical assessment of the biological relationship between simultaneous canine mammary tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, 15(2), 355–365.
- Hampe, J. F., & Misdorp, W. (1974). Tumours and dysplasias of the mammary gland. *Bulletin of the World Health Organization*, 50(1–2), 111–133.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674.

- Hansen, N. M., Grube, B., Ye, X., Turner, R. R., Brenner, R. J., Sim, M.-S., & Giuliano, A. E. (2009). Impact of Micrometastases in the Sentinel Node of Patients With Invasive Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 27(28), 4679–4684.
- Hellmén, E., Bergström, R., Holmberg, L., Spångberg, I.-B., Hansson, K., & Lindgren, A. (1993). Prognostic Factors in Canine Mammary Tumors: A Multivariate Study of 202 Consecutive Cases. *Veterinary Pathology*, 30(1), 20–27.
- Hennighausen, L., & Robinson, G. W. (2001). Signaling Pathways in Mammary Gland Development. *Developmental Cell*, 1(4), 467–475.
- Houvenaeghel, G., Classe, J.-M., Garbay, J.-R., Giard, S., Cohen, M., Faure, C., ... Esterni, B. (2014). Prognostic value of isolated tumor cells and micrometastases of lymph nodes in early-stage breast cancer: A French sentinel node multicenter cohort study. *The Breast*, 23(5), 561–566.
- Im, K. S., Kim, N. H., Lim, H. Y., Kim, H. W., Shin, J. I., & Sur, J. H. (2014). Analysis of a New Histological and Molecular-Based Classification of Canine Mammary Neoplasia. *Veterinary Pathology*, 51(3), 549–559.
- International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. (1990). Prognostic importance of occult axillary lymph node micrometastases from breast cancers. *The Lancet*, 335(8705), 1565–1568.
- Kahn, H. J., Hanna, W. M., Chapman, J.-A. W., Trudeau, M. E., Lickley, H. L. A., Mobbs, B. G., ... Marks, A. (2006). Biological Significance of Occult Micrometastases in Histologically Negative Axillary Lymph Nodes in Breast Cancer Patients Using the Recent American Joint Committee on Cancer Breast Cancer Staging System. *The Breast Journal*, 12(4), 294–301.
- Karayannopoulou, M., Kaldrymidou, E., Constantinidis, T. C., & Dessiris, A. (2005). Histological Grading and Prognosis in Dogs with Mammary Carcinomas: Application of a Human Grading Method. *Journal of Comparative Pathology*, 133(4), 246–252.
- Kimbrough, C. W., McMasters, K. M., Quillo, A., & Ajkay, N. (2015). Occult metastases in node-negative breast cancer: A Surveillance, Epidemiology, and End Results–based analysis. *Surgery*, 158(2), 494–500.
- Klopfleisch, R., von Euler, H., Sarli, G., Pinho, S. S., Gärtner, F., & Gruber, A. D. (2011). Molecular Carcinogenesis of Canine Mammary Tumors: News From an Old Disease. *Veterinary Pathology*, 48(1), 98–116.
- Klopfleisch, R. (2016). Mammary Tumors. In Robert Klopfleisch (Ed.), *Veterinary Oncology*. Cham, CH: Springer International Publishing, pp. 99–108.
- Kristiansen, V. M., Peña, L., Díez Córdova, L., Illera, J. C., Skjerve, E., Breen, A. M., ... Sørenmo, K. U. (2016). Effect of Ovariohysterectomy at the Time of Tumor Removal in Dogs with Mammary Carcinomas: A Randomized Controlled Trial. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30(1), 230–241.
- Kurzman, I. D., & Gilbertson, S. R. (1986). Prognostic factors in canine mammary tumors. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)*, 1(1), 25–32.

## VII Referências Bibliográficas

- Lester, S. C., Bose, S., Chen, Y.-Y., Connolly, J. L., de Baca, M. E., Fitzgibbons, P. L., ... Winer, E. (2009). Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Invasive Carcinoma of the Breast. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 133(10), 1515–1538.
- Lim, H. Y., Im, K. S., Kim, N. H., Kim, H. W., Shin, J. I., & Sur, J. H. (2015). Obesity, expression of adipocytokines, and macrophage infiltration in canine mammary tumors. *The Veterinary Journal*, 203(3), 326–331.
- Maaskant-Braat, A. J., van de Poll-Franse, L. V., Voogd, A. C., Coebergh, J. W. W., Roumen, R. M., Nolthenius-Puylaert, M. C. T., & Nieuwenhuijzen, G. A. (2011). Sentinel node micrometastases in breast cancer do not affect prognosis: a population-based study. *Breast Cancer Research and Treatment*, 127(1), 195–203.
- Madsen, E. V. E., Elias, S. G., van Dalen, T., van Oort, P. M. P., van Gorp, J., Gobardhan, P. D., & Bongers, V. (2013). Predictive factors of isolated tumor cells and micrometastases in axillary lymph nodes in breast cancer. *The Breast*, 22(5), 748–752.
- Martín de las Mulas, J., Niel, M. V., Millán, Y., Ordás, J., Blankenstein, M. A., Mil, F. V., & Misdorp, W. (2002). Progesterone receptors in normal, dysplastic and tumorous feline mammary glands. Comparison with oestrogen receptors status. *Research in Veterinary Science*, 72(2), 153–161.
- Matos, A. J. F., Baptista, C. S., Gärtner, M. F., & Rutteman, G. R. (2012). Prognostic studies of canine and feline mammary tumours: The need for standardized procedures. *The Veterinary Journal*, 193(1), 24–31.
- Matos, A. J. F., Faustino, A. M. R., Lopes, C., Rutteman, G. R., & Gärtner, F. (2006). Detection of lymph node micrometastases in malignant mammary tumours in dogs by cytokeratin immunostaining. *The Veterinary Record*, 158(18), 626–630.
- Miettinen, M. (2014). Immunohistochemistry of soft tissue tumours – review with emphasis on 10 markers. *Histopathology*, 64(1), 101–118.
- Misdorp, W., Cotchin, E., Hampe, J. F., Jabara, A. G., & von Sandersleben, J. (1971). Canine Malignant Mammary Tumours I. Sarcomas. *Veterinary Pathology*, 8(2), 99–117.
- Misdorp, W., Cotchin, E., Hampe, J. F., Jabara, A. G., & von Sandersleben, J. (1972). Canine Malignant Mammary Tumours II. Adenocarcinomas, Solid Carcinomas and Spindle Cell Carcinomas. *Veterinary Pathology*, 9(6), 447–470.
- Misdorp, W., Cotchin, E., Hampe, J. F., Jabara, A. G., & von Sandersleben, J. (1973). Canine Malignant Mammary Tumours. III. Special Types of Carcinomas, Malignant Mixed Tumors. *Veterinary Pathology*, 10(3), 241–256.
- Misdorp, W., Else, R. W., Hellmén, E., & Lipscomb, T. P. (1999). *Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat* (Vol. VII). Armed Forces Institute of Pathology.
- Misdorp, W., & Hart, A. A. (1976). Prognostic factors in canine mammary cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 56(4), 779–786.

- Monteiro-Riviere, N. A. (2006). Integument. In J. A. Eurell & B. L. Frappier (Eds.), *Dellmann's Textbook of Veterinary Histology* (6th ed.). Iowa, USA: Blackwell Publishing, pp. 340–342.
- Moulton, J. E., Rosenblatt, L. S., & Goldman, M. (1986). Mammary Tumors in a Colony of Beagle Dogs. *Veterinary Pathology*, *23*(6), 741–749.
- Naidoo, K., & Pinder, S. E. (2017). Micro- and macro-metastasis in the axillary lymph node: A review. *The Surgeon*, *15*(2), 76–82.
- Nasser, I. A., Lee, A. K. C., Bosari, S., Saganich, R., Heatley, G., & Silverman, M. L. (1993). Occult axillary lymph node metastases in “node-negative” breast carcinoma. *Human Pathology*, *24*(9), 950–957.
- Nelson, L. W., & Kelly, W. A. (1974). Changes in canine mammary gland histology during the estrous cycle. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *27*(1), 113–122.
- Nieto, A., Peña, L., Pérez-Alenza, M. D., Sánchez, M. A., Flores, J. M., & Castaño, M. (2000). Immunohistologic Detection of Estrogen Receptor Alpha in Canine Mammary Tumors: Clinical and Pathologic Associations and Prognostic Significance. *Veterinary Pathology*, *37*(3), 239–247.
- Nødtvedt, A., Berke, O., Bonnett, B. N., & Brønden, L. (2012). Current status of canine cancer registration – report from an international workshop. *Veterinary and Comparative Oncology*, *10*(2), 95–101.
- Ordóñez, N. G. (2013). Broad-spectrum immunohistochemical epithelial markers: a review. *Human Pathology*, *44*(7), 1195–1215.
- Orfanou, D. C., Pourlis, A., Ververidis, H. N., Mavrogianni, V. S., Taitzoglou, I. A., Boscós, C. M., & Fthenakis, G. C. (2010). Histological Features in the Mammary Glands of Female Dogs throughout Lactation. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, *39*(5), 473–478.
- Owen, L. N., Brodey, R. S., Gillette, E. L., Milouchine, V. N., Misdorp, W., Parodi, A.-L., ... Theilen, G. H. (1980). *TNM Classification of Tumours in Domestic Animal*. Geneva: World Health Organization.
- Patsikas, M. N., & Dessiris, A. (1996a). The Lymph Drainage of the Mammary Glands in the Bitch: a Lymphographic Study. Part I: The 1st, 2nd, 4th and 5th Mammary Glands. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, *25*(2), 131–138.
- Patsikas, M. N., & Dessiris, A. (1996b). The Lymph Drainage of the Mammary Glands in the Bitch: a Lymphographic Study. Part II: the 3rd Mammary Gland. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, *25*(2), 139–143.
- Patsikas, M. N., Karayannopoulou, M., Kaldrymidoy, E., Papazoglou, L. G., Papadopoulou, P. L., Tzegas, S. I., ... Dessiris, A. K. (2006). The Lymph Drainage of the Neoplastic Mammary Glands in the Bitch: A Lymphographic Study. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, *35*(4), 228–234.
- Peña, L., Andrés, P. J. D., Clemente, M., Cuesta, P., & Pérez-Alenza, M. D. (2013). Prognostic Value of Histological Grading in Noninflammatory Canine Mammary

## VII Referências Bibliográficas

- Carcinomas in a Prospective Study With Two-Year Follow-Up: Relationship With Clinical and Histological Characteristics. *Veterinary Pathology*, 50(1), 94–105.
- Peña, L., Gama, A., Goldschmidt, M. H., Abadie, J., Benazzi, C., Castagnaro, M., ... Mulas, J. M. de las. (2014). Canine Mammary Tumors: A Review and Consensus of Standard Guidelines on Epithelial and Myoepithelial Phenotype Markers, HER2, and Hormone Receptor Assessment Using Immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, 51(1), 127–145.
- Pereira, C. T., Rahal, S. C., de Carvalho Balieiro, J. C., & Ribeiro, A. a. C. M. (2003). Lymphatic Drainage on Healthy and Neoplastic Mammary Glands in Female Dogs: Can it Really be Altered? *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 32(5), 282–290.
- Pérez Alenza, M. D., Peña, L., Nieto, A. I., & Castaño, M. (1997). Clinical and pathological prognostic factors in canine mammary tumors. *Annali Dell'Istituto Superiore Di Sanita*, 33(4), 581–585.
- Philibert, J. C., Snyder, P. W., Glickman, N., Glickman, L. T., Knapp, D. W., & Waters, D. J. (2003). Influence of Host Factors on Survival in Dogs with Malignant Mammary Gland Tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17(1), 102–106.
- Pinho, M. S., & Gulbenkian, S. (2007). Innervation of the canine mammary gland: an immunohistochemical study. *Histology and Histopathology*, 22(11), 1175–1184.
- Pretzer, S. D. (2008). Canine embryonic and fetal development: A review. *Theriogenology*, 70(3), 300–303.
- Priester, W. A. (1979). Occurrence of mammary neoplasms in bitches in relation to breed, age, tumour type, and geographical region from which reported. *Journal of Small Animal Practice*, 20(1), 1–11.
- Queiroga, F. L., Pérez-Alenza, D., González-Gil, A., Silván, G., Peña, L., & Illera, J. (2015). Serum and Tissue Steroid Hormone Levels in Canine Mammary Tumours: Clinical and Prognostic Implications. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(5), 858–865.
- Queiroga, F. L., Pérez-Alenza, D., Silvan, G., Peña, L., & Illera, J. C. (2009). Positive correlation of steroid hormones and EGF in canine mammary cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 115(1–2), 9–13.
- Queiroga, F. L., Pérez-Alenza, M. D., Silvan, G., Peña, L., Lopes, C., & Illera, J. C. (2005). Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 94(1), 181–187.
- Queiroga, F. L., Pérez-Alenza, M. D., Silvan, G., Peña, L., Lopes, C. S., & Illera, J. C. (2008). Crosstalk between GH/IGF-I axis and steroid hormones (progesterone, 17 $\beta$ -estradiol) in canine mammary tumours. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 110(1), 76–82.
- Queiroga, F. L., Raposo, T., Carvalho, M. I., Prada, J., & Pires, I. (2011). Canine Mammary Tumours as a Model to Study Human Breast Cancer: Most Recent Findings. *In Vivo*, 25(3), 455–465.
- Ramos-Vara, J. A., Kiupel, M., Baszler, T., Bliven, L., Brodersen, B., Chelack, B., ... Valli, V. E. (2008). Suggested Guidelines for Immunohistochemical Techniques in Veterinary

- Diagnostic Laboratories. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20(4), 393–413.
- Rasotto, R., Goldschmidt, M. H., Castagnaro, M., Carnier, P., Caliani, D., & Zappulli, V. (2014). The Dog as a Natural Animal Model for Study of the Mammary Myoepithelial Basal Cell Lineage and its Role in Mammary Carcinogenesis. *Journal of Comparative Pathology*, 151(2), 166–180.
- Rasotto, R., Zappulli, V., Castagnaro, M., & Goldschmidt, M. H. (2012). A Retrospective Study of Those Histopathologic Parameters Predictive of Invasion of the Lymphatic System by Canine Mammary Carcinomas. *Veterinary Pathology*, 49(2), 330–340.
- Rasotto, R., Berlato, D., Goldschmidt, M. H., & Zappulli, V. (2017). Prognostic Significance of Canine Mammary Tumor Histologic Subtypes: An Observational Cohort Study of 229 Cases. *Veterinary Pathology*, 54(4), 571–578.
- Reed, J., Rosman, M., Verbanac, K. M., Mannie, A., Cheng, Z., & Taft, L. (2009). Prognostic Implications of Isolated Tumor Cells and Micrometastases in Sentinel Nodes of Patients with Invasive Breast Cancer: 10-Year Analysis of Patients Enrolled in the Prospective East Carolina University/Anne Arundel Medical Center Sentinel Node Multicenter Study. *Journal of the American College of Surgeons*, 208(3), 333–340.
- Reese, S., Budras, K.-D., Mülling, C., Bragulla, H., & König, H. E. (2014). Common integument (integumentum commune). In *Veterinary Anatomy of Domestic Mammals: Textbook and Colour Atlas* (6th ed.). Stuttgart - New York: Schattauer, p. 629-680.
- Rehm, S., Stanislaus, D. J., & Williams, A. M. (2007). Estrous cycle-dependent histology and review of sex steroid receptor expression in dog reproductive tissues and mammary gland and associated hormone levels. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 80(3), 233–245.
- Rivera, P., & von Euler, H. (2011). Molecular Biological Aspects on Canine and Human Mammary Tumors. *Veterinary Pathology*, 48(1), 132–146.
- Rovera, F., Fachinetti, A., Rausei, S., Chiappa, C., Lavazza, M., Arlanti, V., ... Dionigi, R. (2013). Prognostic role of micrometastases in sentinel lymph node in patients with invasive breast cancer. *International Journal of Surgery*, 11(Supplement 1), 73–78.
- Ruberte, J., Sautet, J. Y., Gine, J. M., Lopez, C., & Rodriguez, A. (1990). Topographie des Collecteurs Lymphatiques Mammaires de la Chienne. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 19(4), 347–358.
- Rutteman, G., & Misdorp, W. (1993). Hormonal background of canine and feline mammary tumours. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 47, 483–487.
- Rutteman, G. R., Withrow, S. J., & MacEwan, E. G. (2001). Tumors of the mammary gland. In S. J. Withrow & E. G. MacEwan (Eds.), *Small Animal Clinical Oncology* (3rd ed.). Philadelphia: WB Saunders, pp. 455–477.
- Salhab, M., Patani, N., & Mokbel, K. (2011). Sentinel lymph node micrometastasis in human breast cancer: an update. *Surgical Oncology*, 20(4), 195-206.

## VII Referências Bibliográficas

- Sánchez-Céspedes, R., Millán, Y., Guil-Luna, S., Reymundo, C., Espinosa de los Monteros, A., & Martín de las Mulas, J. (2016). Myoepithelial cells in canine mammary tumours. *The Veterinary Journal*, *207*, 45–52.
- Santos, A. A., & Matos, A. J. F. (2015). Advances in the understanding of the clinically relevant genetic pathways and molecular aspects of canine mammary tumours. Part 2: Invasion, angiogenesis, metastasis and therapy. *The Veterinary Journal*, *205*(2), 144–153.
- Santos, A. A., Lopes, C. C., Ribeiro, J. R., Martins, L. R., Santos, J. C., Amorim, I. F., ... Matos, A. J. (2013). Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. *BMC Veterinary Research*, *9*(1), 1-11.
- Santos, M., Marcos, R., & Faustino, A. M. R. (2010). Histological Study of Canine Mammary Gland During the Oestrous Cycle. *Reproduction in Domestic Animals*, *45*(5), 146–154.
- Santos, M., Correia-Gomes, C., Marcos, R., Santos, A., De Matos, A., Lopes, C., & Dias-Pereira, P. (2015). Value of the Nottingham Histological Grading Parameters and Nottingham Prognostic Index in Canine Mammary Carcinoma. *Anticancer Research*, *35*(7), 4219–4227.
- Sarli, G., Preziosi, R., Benazzi, C., Castellani, G., & Marcato, P. S. (2002). Prognostic Value of Histologic Stage and Proliferative Activity in Canine Malignant Mammary Tumors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *14*(1), 25–34.
- Schneider, R., Dorn, C. R., & Taylor, D. O. (1969). Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *Journal of the National Cancer Institute*, *43*(6), 1249–1261.
- Schneider, R. (1970). Comparison of age, sex, and incidence rates in human and canine breast cancer. *Cancer*, *26*(2), 419–426.
- Shofer, F. S., Sonnenschein, E. G., Goldschmidt, M. H., Laster, L. L., & Glickman, L. T. (1989). Histopathologic and dietary prognostic factors for canine mammary carcinoma. *Breast Cancer Research and Treatment*, *13*(1), 49–60.
- Silver, I. A. (1966). The Anatomy of the Mammary Gland of the Dog and Cat. *Journal of Small Animal Practice*, *7*(11), 689–696.
- Sinowatz, S., Wrobel, K. H., El Etreby, M. F., & Sinowatz, F. (1980). On the ultrastructure of the canine mammary gland during pregnancy and lactation. *Journal of Anatomy*, *131*(Pt 2), 321–332.
- Sleeckx, N., Van Brantegem, L., Van den Eynden, G., Fransen, E., Casteleyn, C., Van Cruchten, S., ... Van Ginneken, C. (2014). Lymphangiogenesis in Canine Mammary Tumours: A Morphometric and Prognostic Study. *Journal of Comparative Pathology*, *150*(2–3), 184–193.
- Sorenmo, K. U., Kristiansen, V. M., Cofone, M. A., Shofer, F. S., Breen, A.-M., Langeland, M., ... Goldschmidt, M. H. (2009). Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence\*. *Veterinary and Comparative Oncology*, *7*(3), 162–172.

- Sorenmo, K. U., Worley, D. R., & Goldschmidt, M. H. (2013). Tumors of the mammary gland. In S. J. Withrow, D. M. Vail, & R. L. Page (Eds.), *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* (5th ed.). St. Louis, MO: Elsevier, pp. 538–556.
- Sorenmo, K. U. (2003). Canine mammary gland tumors. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 33(3), 573–596.
- Sorenmo, K. U., Shofer, F. S., & Goldschmidt, M. H. (2000). Effect of Spaying and Timing of Spaying on Survival of Dogs with Mammary Carcinoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 14(3), 266–270.
- Sorenmo, K. U., Rasotto, R., Zappulli, V., & Goldschmidt, M. (2011). Development, Anatomy, Histology, Lymphatic Drainage, Clinical Features, and Cell Differentiation Markers of Canine Mammary Gland Neoplasms. *Veterinary Pathology*, 48(1), 85–97.
- Spoerri, M., Guscetti, F., Hartnack, S., Boos, A., Oei, C., Balogh, O., ... Kowalewski, M. P. (2015). Endocrine control of canine mammary neoplasms: serum reproductive hormone levels and tissue expression of steroid hormone, prolactin and growth hormone receptors. *BMC Veterinary Research*, 11(235), 1-10.
- Støovring, M., Moe, L., & Glattre, E. (1997). A population-based case-control study of canine mammary tumours and clinical use of medroxyprogesterone acetate. *APMIS*, 105(7–12), 590–596.
- Susnik, B., Frkovic-Grazio, S., & Bracko, M. (2004). Occult Micrometastases in Axillary Lymph Nodes Predict Subsequent Distant Metastases in Stage I Breast Cancer: A Case-Control Study with 15-Year Follow-Up. *Annals of Surgical Oncology*, 11(6), 568–572.
- Szczubial, M., & Lopuszynski, W. (2011). Prognostic value of regional lymph node status in canine mammary carcinomas. *Veterinary and Comparative Oncology*, 9(4), 296-303.
- Tan, Y.-Y., Wu, C.-T., Fan, Y.-G., Hwang, S., Ewing, C., Lane, K., ... Leong, S. P. L. (2005). Primary Tumor Characteristics Predict Sentinel Lymph Node Macrometastasis in Breast Cancer. *The Breast Journal*, 11(5), 338–343.
- Taylor, G. N., Shabestari, L., Williams, J., Mays, C. W., Angus, W., & McFarland, S. (1976). Mammary Neoplasia in a Closed Beagle Colony. *Cancer Research*, 36(8), 2740–2743.
- Tsuda, H. (2015). Histological examination of sentinel lymph nodes: significance of macrometastasis, micrometastasis, and isolated tumor cells. *Breast Cancer*, 22(3), 221–229.
- Turner, R. R., Giuliano, A. E., Hoon, D. S., Glass, E. C., & Krasne, D. L. (2001). Pathologic examination of sentinel lymph node for breast carcinoma. *World Journal of Surgery*, 25(6), 798–805.
- van Garderen, E., de Wit, M., Voorhout, W. F., Rutteman, G. R., Mol, J. A., Nederbragt, H., & Misdorp, W. (1997). Expression of growth hormone in canine mammary tissue and mammary tumors. Evidence for a potential autocrine/paracrine stimulatory loop. *The American Journal of Pathology*, 150(3), 1037–1047.

## VII Referências Bibliográficas

- van Garderen, Evert, & Schalken, J. A. (2002). Morphogenic and tumorigenic potentials of the mammary growth hormone/growth hormone receptor system. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 197(1), 153–165.
- Vascellari, M., Capello, K., Carminato, A., Zanardello, C., Baioni, E., & Mutinelli, F. (2016). Incidence of mammary tumors in the canine population living in the Veneto region (Northeastern Italy): Risk factors and similarities to human breast cancer. *Preventive Veterinary Medicine*, 126, 183–189.
- Weaver, D. L., Ashikaga, T., Krag, D. N., Skelly, J. M., Anderson, S. J., Harlow, S. P., ... Wolmark, N. (2011). Effect of Occult Metastases on Survival in Node-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 364(5), 412–421.
- Webster, J. D., Dennis, M. M., Dervisis, N., Heller, J., Bacon, N. J., Bergman, P. J., ... Kiupel, M. (2011). Recommended Guidelines for the Conduct and Evaluation of Prognostic Studies in Veterinary Oncology. *Veterinary Pathology*, 48(1), 7–18.
- Yamagami, T., Kobayashi, T., Takahashi, K., & Sugiyama, M. (1996). Prognosis for Canine Malignant Mammary Tumors Based on TNM and Histologic Classification. *Journal of Veterinary Medical Science*, 58(11), 1079–1083.