

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**METÁSTASES DE CARCINOMA DE MAMA EM CADELAS:  
AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE LINFONODO SENTINELA**

**HUGO ENRIQUE ORSINI BESERRA**

**Botucatu-SP  
Fevereiro/2014**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**METÁSTASES DE CARCINOMA DE MAMA EM CADELAS:  
AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE LINFONODO SENTINELA**

**HUGO ENRIQUE ORSINI BESERRA**

Dissertação apresentada junto ao  
Programa de Pós-graduação em  
Medicina Veterinária para obtenção  
do título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Noeme Sousa Rocha

Botucatu-SP  
Fevereiro/2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Beserra, Hugo.

Metástases de carcinoma de mama em cadelas : avaliação da técnica de linfonodo sentinela / Hugo Beserra. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Noeme Sousa Rocha

Capes: 50503022

1. Cão - Doenças. 2. Mamas - Câncer. 3. Gânglios linfáticos - Biópsia. 4. Metástase. 5. Mastectomia.

Palavras-chave: Azul patente; Carcinoma; Linfonodo sentinela; Metástase.

Nome do Autor: Hugo Enrique Orsini Beserra

Título: METÁSTASES DE CARCINOMA DE MAMA EM CADELAS:  
AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE LINFONODO SENTINELA

COMISSÃO EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Noeme Sousa Rocha  
Presidente e Orientadora  
Departamento de Clínica Veterinária  
FMVZ – UNESP - Botucatu

---

Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Rozany Dufloth  
Membro  
Departamento de Patologia  
FMB – UNESP - Botucatu

---

Prof. Dr. Luiz Gonzaga Porto Pinheiro  
Membro  
Departamento de Cirurgia  
Fac. Med. – UFC – Fortaleza

Data da Defesa: 20 de Fevereiro de 2014

Aos meus pais, irmãos, amigos e animais, por fazerem de mim o que sou hoje.  
**Dedico.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Grande Pai Celeste, por colocar em minha vida pessoas tão maravilhosas.

À minha orientadora **Profa. Dra. Noeme Rocha**, pela oportunidade, valiosos ensinamentos, paciência e acima de tudo, confiança em mim.

Ao **Prof. Dr. Luiz Porto**, a quem devo grande parte deste trabalho, pelo exemplo de Mestre devotado e entusiasmo contagiante pela vida acadêmica.

A minha querida amiga **Clarice Oie**, pela ajuda constante, amizade verdadeira e pessoa maravilhosa que tive a imensa alegria de ter como amiga.

À minha querida amiga **Valéria Dalanezi**, a Sra. Val, por não poupar esforços em me ajudar todas as vezes que precisei mostrando-se sempre solícita, acessível e paciente, até com a minhas bagunças em seu laboratório.

À **Profa. Dra. Maria Cecília Rui Luvizotto**, pela inspiração de uma vida devotada à patologia e pela amizade e carinho. Sinto-me honrado em poder contar com a senhora.

Aos colegas Médico-Veterinários do Serviço Veterinário da Anclivepa/SP, **Karym Cardoso, Jiuli Sales, Lucas Freitas, Marina Visconti** pela imensa ajuda neste projeto.

Aos queridos amigos e colegas de Patologia, **Fabrizio Grandi, Leonardo Dourado, Marcela Marcondes, Priscila Kobayashi, Diogo Zanoni, Carlos Eduardo, Leonardo Pavan e Juliano Nóbrega**, pelos momentos divertidos, amizade e auxílio que sempre me deram. Certamente vocês fizeram o meu mestrado ainda mais inesquecível.

À minha amada Mãe, **Auxiliadora Orsini**, pelo exemplo de fibra e amor materno, de carinho inconfundível, que mesmo a distancia me faz sentir protegido e amado. Obrigado por tudo Mãezinha.

Ao meu querido Pai, **Vilmar Beserra**, pelo carinho e pessoa valiosa que é, sempre me ensinando as melhores virtudes. Sempre carrego em meu coração.

Aos meus avós, em especial ao “**Vovô Quinco**”, pelo carinho que me deixa saudade.

Aos meus irmãos **Diego e Naila Beserra** pela amizade e por saber que sempre poderei contar com o carinho e apoio de vocês. Sempre estaremos unidos.

A minha querida Tia-Mãe **Gorette Vasconcelos**, pessoa que muito admiro, por me acolher, apoiar e acreditar em mim, sempre dedicada e cuidadosa. Só tenho a agradecer.

À **Ana Paula**, “Parrinha”, pelo cuidado, carinho e dedicação nos meus anos de infância e ainda hoje.

À **Lis, Eva, Clô e Bim-Bim e Abu** por todos os dias que me fazem sentir a pessoa mais importante do mundo e servirem de estímulo e consolo nos dias difíceis da vida.

Aos membros da banca pela disponibilidade.

A todos que contribuíram para que este trabalho fosse realizado. Muito obrigado!

*“Sei muito pouco, mas tenho ao meu favor tudo que não sei.”*

(Clarice Lispector)



**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1:</b> Local de injeção do corante vital Azul Patente V com intensa marcação de canalículos linfáticos dérmicos.....	9
<b>Figura 2:</b> Proliferação neoplásica de células carcinomatosas, acompanhada de proliferação e metaplasia condroide típica.....	19
<b>Figura 3:</b> Células carcinomatosas da mama em arranjo sólido.....	19
<b>Figura 4:</b> Linfonodo sentinela com foco de células neoplásicas metastáticas em arranjo cístico-papilar.....	19
<b>Figura 5:</b> Linfonodo com êmbolo neoplásico obstruindo a luz de vaso linfático.....	19
<b>Figura 6:</b> Células metastáticas no linfonodo sentinela exibindo marcação imunohistoquímica para o anticorpo AE1/AE2.....	19
<b>Figura 7:</b> Células metastáticas nodais exibindo marcação para o anticorpo CK14.....	19
<b>Figura 8:</b> Pequeno grupo de células metastáticas com marcação para o anticorpo AE1/AE3.....	20

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1:</b> Graduação de malignidade em carcinomas mamários de cadelas.....	10
<b>Tabela 2:</b> Dados referentes às mamas acometidas e aos linfonodos avaliados.....	13

## SUMÁRIO

RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Aspectos clínicos e epidemiológicos dos carcinomas mamários.....	2
2.2. Estadiamento clínico e anatomopatológico das neoplasias mamárias..	2
2.3. Drenagem linfática e vias de metástase mamária.....	3
2.4. Técnica do linfonodo sentinela.....	4
3. OBJETIVOS.....	6
3.1. Objetivo geral.....	6
3.2. Objetivos específicos.....	6
4. HIPÓTESE DO ESTUDO.....	6
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	7
5.1. Animais.....	7
5.2. Avaliação citopatológica das neoplasias.....	7
5.3. Procedimento anestésico.....	8
5.4. Identificação e exérese dos linfonodos sentinela.....	8
5.5. Acompanhamento e avaliação de morbidade pós-operatória.....	9
5.6. Avaliação macroscópica e histopatológica das neoplasias.....	10
5.7. Avaliação macroscópica, histopatológica e imuno-histoquímica dos linfonodos.....	10
5.8. Estudo imuno-histoquímico dos tumores e linfonodos	11
6. RESULTADOS.....	12
7. DISCUSSÃO.....	14
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	20
9. CONCLUSÃO.....	21
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
ANEXOS.....	31

## RESUMO

A avaliação microscópica dos linfonodos em cadelas portadoras de carcinoma de mama pode desempenhar um papel fundamental no direcionamento terapêutico, já que a drenagem linfática representa a via mais comum de metástases. Nos últimos anos tem-se desenvolvido técnicas que oferecem excelente acurácia na remoção dos linfonodos, como a Técnica do Linfonodo Sentinela (TLS), que se baseia no princípio de progressão escalonada na drenagem linfática de neoplasias e que atualmente é o principal fator prognóstico e diagnóstico em mulheres portadoras de carcinomas de mama. O objetivo da pesquisa foi avaliar de forma inédita a acurácia da biópsia do linfonodo sentinela em cadelas portadoras de carcinoma de mama. Foram utilizadas 41 cadelas com diagnóstico citológico do tumor. Após injeção do corante azul patente V, procedeu-se a mastectomia, juntamente com a linfadenectomia (sentinelas e não sentinelas). O material foi submetido a cortes seriados e avaliado microscopicamente pela coloração rotineira de H&E e imuno-histoquímica com os marcadores para pan-citoqueratina AE1/AE3 e células mioepiteliais CK14, que revelou que 46,3% (19/41) dos animais apresentavam metástase nodal. Os valores de sensibilidade e especificidade encontrados para a TLS foram de 89,5% e 100%, respectivamente, com índice kappa igual a 0,90 e  $p < 0,0001$ . Portanto, a TLS oferece alta sensibilidade no diagnóstico precoce de micrometástases, permitindo maior precisão no estadiamento do paciente oncológico e consequentemente, maiores chances de sobrevida.

**Palavras-chave:** Metástase, linfonodo sentinela, neoplasia mamária, azul patente, cadela

### ABSTRACT

Microscopic evaluation of lymph nodes in bitches with mammary carcinomas may have fundamental importance in guidance the therapy since lymphatic drainage constitutes the most common route for metastasis. In recent years, several techniques have been used to detect and remove Sentinel Lymph Nodes (SLN) based on the principle of stepwise progression of cancer and lymphatic drainage. In human medicine, SLN biopsy and analysis constitutes the main prognostic factor in women with mammary carcinomas. This study was designed to evaluate, in an unprecedented manner, the accuracy of sentinel lymph node biopsy in bitches with mammary carcinomas. Forty-one dogs with no predilection for breed or age, with previous cytological diagnosis of mammary carcinoma were submitted to inoculation of patent blue V dye in peritumoral skin, followed by radical mastectomy and radical lymphadenectomy. Lymphadenectomy included sentinel and non- sentinel lymph nodes in order to detect lymph node metastasis. Both groups were compared in order to determine the accuracy of SLN technique in the detection of node metastasis. The lymph nodes were subject to a standard serial sectioning method, stained by routine H&E or submitted to immunohistochemistry using pan-cytokeratins AE1/AE3 and the myoepithelial marker CK14. Nineteen animals (46.3%) had nodal metastasis. Sensibility and specificity for SLN technique were 89.5 % and 100 %, respectively, with a kappa value of 0.90 ( $p < 0.0001$ ). Therefore, SLN biopsy offers high sensitivity in the early diagnosis of lymph node metastasis allowing a more accurate clinical staging. These results probably impacts on greater chances of patient survival.

**Key words:** Metastasis, sentinel lymph node, mammary tumor, patent blue V.

## 1. INTRODUÇÃO

Os tumores mamários são as mais frequentes neoplasias que acometem as cadelas, correspondendo a 50% de todos os neoplasmas, tornando-se um importante problema na medicina veterinária, haja vista que aproximadamente 71% são carcinomas (DALECK et al., 1998; OLIVEIRA FILHO et al., 2010, CASSALI et al., 2011). Estudos sobre causas de mortalidade em cães revelaram que esses tumores foram responsáveis por 40,9% dos óbitos por neoplasia (TRAPP et al., 2010).

As neoplasias mamárias de cadelas são similares às observadas na mulher, o que torna a espécie canina um ótimo modelo para estudos comparativos em termos diagnósticos, prognósticos, morfológicos e biológicos (CASSALI et al., 2007).

Atualmente, um dos principais objetivos da oncologia humana é identificar fatores prognósticos que possam estabelecer protocolos terapêuticos que propiciem melhores resultados de sobrevida dos seus pacientes.

Aliado a isso, o elevado número de tumores mamários em cadelas aumentou exponencialmente o interesse científico nesta entidade, melhorando consideravelmente o desempenho de ensaios clínicos, aplicáveis a medicina comparada (QUEIROGA et al., 2011).

Estes resultados servem como base não só para o desenvolvimento da oncologia humana, mas podem auxiliar na evolução dos métodos diagnósticos e terapêuticos na medicina veterinária (CASSALI et al., 2007; QUEIROGA et al., 2011).

Um exemplo disso é o estudo das vias de metástase mamária. A técnica do linfonodo sentinela (TLS) tem sido amplamente utilizada em mulheres com carcinoma de mama ao redor do mundo, uma vez que garante informações prognósticas com baixo índice de morbidade (TAKAMARU et al., 2014).

Entretanto, apenas a partir da sua utilização em ensaios experimentais, visando o aprimoramento da técnica em mulheres, é que o método passou a ser empregado em cadelas (PINHEIRO et al., 2003).

Apesar da demonstrada eficácia da técnica na marcação dos linfonodos, pouco se conhece sobre linfonodo sentinela em cadelas e a implicação das metástases nodais na sobrevida destes animais.

Torna-se necessário, portanto, a validação da TLS na medicina veterinária, para que a biópsia do linfonodo sentinela seja uma realidade e mais estudos comparativos possam ser realizados com novas perspectivas para ambas as pacientes.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Aspectos clínicos e epidemiológicos dos carcinomas mamários**

Tumores mamários de cadelas glândula mamária afetar cadelas de meia idade e idosos que são sexualmente intactos ou esterilizados (EGENVALL et al., 2005). Estas neoplasias apresentam aspectos clínicos e anatomopatológicos similares aos encontrados na mulher, entretanto a ocorrência de tumor mamário nos cães é três vezes maior que na espécie humana (CASSALI et al., 2007).

A maioria dos cães com tumores mamários são clinicamente saudáveis no momento do diagnóstico e os tumores podem ser identificados pelo proprietário ou um profissional durante um exame de rotina (SORENMO, et al., 2011). Similar ao que ocorre na espécie humana, a entidade afeta quase que exclusivamente as fêmeas, com maior ocorrência nas cadelas idosas ou de meia idade (TORÍBIO, et al., 2012).

As neoplasias mamárias caninas comumente apresentam-se como nódulos circunscritos, de tamanho variável, consistência firme e mobilidade para a pele eo músculo. Eles também podem ser associados à ulceração da pele e reações inflamatórias locais. As mamas abdominais caudais e inguinais costumam ser afetadas com maior frequência, seja sob a forma de um único nódulo ou de vários (MISDORP, 2002).

### **2.2. Estadiamento clínico e anatomopatológico das neoplasias mamárias**

O estadiamento clínico oncológico de humanos e animais se baseia no sistema TNM, criado pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Este sistema considera informações como tamanho da lesão primária (T), disseminação para linfonodos regionais (N) e presença de metástases a distancia (M) (MORRIS & DOBSON, 2007).

Nas mulheres portadoras de tumores de mama, a avaliação dos linfonodos regionais é realizada pela BLS, segundo recomendações da American Joint Committee on Cancer (AJCC) (EDGE et al., 2010).

A invasão de vasos linfáticos e linfonodos tem importante impacto na sobrevida de cadelas com tumores mamários. Animais com metástases de linfonodos apresentam uma diminuição significativa na sobrevida quando comparados com os indivíduos que negativos para metástase nodal (SORENMO et al., 2011; CAVALCANTI & CASSALI, 2006).

Classificação histopatológica baseada nas variações morfológicas do núcleo e do grau histológico apresenta uma correlação significativa com a agressividade do tumor (ELSTON E ELLIS, 1991). Atualmente, na medicina humana, o sistema de classificação mais amplamente usado o Nottingham modificado por Elston e Ellis (



1991), que substituiu as avaliações subjetivas da técnica anterior. O método permite Nottingham os fatores a serem avaliados utilizando sistematicamente mais critérios objetivos.

De acordo com este sistema , a determinação do grau histológico baseia-se na avaliação do túbulo índice de formação, nuclear pleomorfismo e índice mitótico, como demonstrado na Tabela 1.

A anaplasia aumenta com do grau, que é considerado indicador prognóstico independente para o carcinoma de mama em mulheres

### **2.3. Drenagem linfática e vias de metástase mamária**

As metástases de carcinomas mamários ocorrem, em sua maioria, por via linfática, em até 70% dos casos ou por via hematogena, mediante a infiltração de células neoplásicas através da parede de vasos linfáticos ou sanguíneos (SORENMO et al., 2011).

As metástases nodais são, portanto, o passo inicial na disseminação tumoral sendo assim um dos fatores prognósticos mais importantes no diagnóstico das neoplasias de mama em mulheres e cadelas, uma vez que comumente são seguidas pelo desenvolvimento de tumores à distância, levando o paciente à morte (QUADROS & GEBRIM, 2007). A avaliação dos linfonodos é, portanto, um dos fatores de maior relevância no estadiamento prognóstico do carcinoma de mama em mulheres e cadelas (MATOS et al., 2012).

Apesar disso, um estadiamento realmente preciso ainda permanece um dos maiores problemas para a oncologia mamária de cadelas, pois esta análise depende de diversos fatores e atualmente se baseia apenas no tipo histológico da neoplasia e no grau de invasão tumoral, deixando de lado importantes informações como a presença de células cancerosas nos linfonodos regionais. (MISDORP, 2002; CAVALCANTI & CASSALI, 2006; SORENMO et al., 2009; MATOS et al., 2006a; MATOS et al., 2012).

Na atualidade, ainda existem inúmeras controvérsias sobre a direção da drenagem e conexões linfáticas entre as mamas das cadelas, já que alterações anatômicas não permitem o estabelecimento de um padrão de drenagem (SORENMO et al., 2011).

Essa problemática conduz a um estadiamento anatomopatológico que se restringe ao índice de formação tubular, pleomorfismo nuclear e índice mitótico, distanciando o paciente de tratamentos adequados e diminuindo as chances de eficácia

terapêutica (KARAYANNOPOULOU et al., 2005; PLIEGO et al., 2008; MATOS et al., 2006a; MATOS et al., 2012).

Apesar do conhecimento dos linfossomos mamários, sítios regionais de drenagem linfáticas, inúmeros estudos têm revelado que a presença de tumores pode alterar significativamente a direção linfática da mama, uma vez que animais portadores de neoplasias mamárias passam por uma reconfiguração linfática, que se deve, em grande parte, à presença de fatores prolinfangiogênicos no sítio tumoral (MATOS et al., 2012; PATSIKAS et al., 2006; SUAMI et al., 2013).

Por este fato, torna-se difícil estabelecer quais linfonodos devem ser removidos durante o procedimento cirúrgico. A exérese de forma aleatória induz a graves erros prognósticos, contribuindo para o pouco conhecimento acerca do real valor das micro e macrometástases regionais nos carcinomas de mama em cadelas. Além disso, a metodologia empregada na avaliação destes linfonodos e o pequeno número de secções oferece dificuldade na pesquisa de focos metastáticos (MATOS et al., 2012).

#### **2.4. Técnica do Linfonodo Sentinela**

Nos últimos anos, têm-se desenvolvido técnicas que auxiliam no estabelecimento de um melhor prognóstico, como a técnica do linfonodo sentinela (TLS), que se baseia no princípio de progressão escalonada na colonização dos linfonodos regionais por células neoplásicas (PINHEIRO et al., 2003; GATEK et al., 2012).

O linfonodo sentinela (LS) é o primeiro linfonodo em uma cadeia linfática regional a receber a linfa de um tumor primário, portanto, será o primeiro a conter uma metástase e sua biopsia revela com precisão o “status” nodal. Assim, se na biopsia do linfonodo sentinela (BLS) não forem encontradas células tumorais, o restante da cadeia nodal também será negativa, indicando não haver metástase linfática (SAKORAFAS et al., 2007; KELLEY et al., 2004).

Esta técnica foi empregada inicialmente em homens portadores de carcinomas penianos e anos depois, com o sucesso do método, passou a ser utilizada em neoplasias melanocíticas (CABANAS, 1977). Estudos considerando sua aplicabilidade em tumores de mama em mulheres datam do início dos anos 1990 (KRAG et al., 1993). Desde então, a realização da BLS tem se revelado alternativa segura, com elevada acurácia para predizer o comprometimento nodal (PINHEIRO et al., 2003; SAKORAFAS et al., 2007).

A ausência de metástases no linfonodo sentinela de mulheres portadoras de carcinomas mamários concorda com o resultado dos demais linfonodos regionais em quase 100% dos casos (ZENDEL et al., 2013).

Uma vez que não se faz necessária a retirada de toda a cadeia linfática, há redução quase que total no risco de aparecimento de linfedema, com manutenção das taxas de sucesso no estabelecimento do prognóstico. Além disso, a BLS permite o diagnóstico precoce de metástases, auxiliando na conduta terapêutica e aumentando as chances de sucesso no tratamento (GIULIANO et al., 2011).

A partir da introdução do procedimento na prática cirúrgica, as micrometástases de linfonodos passaram a ser detectadas mais comumente. Isso ocorre porque o patologista pode se concentrar na inspeção um ou poucos linfonodos, tornando a busca por metástases mais cuidadosa. Além disso, a pequena quantidade de peças permite um maior número de seções, aumentando a eficácia diagnóstica da técnica (VERONESI et al., 1999).

As técnicas de localização transoperatórias do LS se valem de corantes vitais, radiofármacos ou da utilização de ambos simultaneamente. No Brasil, bem como na Europa, o corante de escolha é o azul patente V (AP), que pertence ao grupo dos triarilmetanos com apenas um grupo hidroxila adicional (ZENDEL et al., 2013).

Trabalhos utilizando o AP em cultivo de células de endotélio corneal demonstraram ausência de citotoxicidade, sem qualquer efeito deletério para o cultivo, mesmo em altas concentrações, evidenciando sua excelente biocompatibilidade, com boas perspectivas de uso do corante em cirurgias oftálmicas (THALER et al., 2011).

Complicações oriundas da aplicação do corante são bastante raras, havendo relatos da ocorrência de reação de hipersensibilidade em apenas 0,1 a 1,1% dos pacientes submetidos à técnica (SHINZATO et al., 2006).

Além disso, marcadores autólogos tem sido utilizados com êxito em cadelas em ensaios experimentais, como a hemossiderina, que marca o linfonodo sentinela mediante a inoculação de um preparado sanguíneo hemolisado. Apesar de eficaz, a técnica ainda necessita de maiores estudos (PINHEIRO et al., 2009; BESERRA et al., 2013).

Nos tumores de mama, diferentes locais de injeção do corante têm sido recomendados para identificação do LS, como periaureolar, subaureolar, intradérmica ou subcutânea, na área de localização do tumor (GOYAL et al., 2006).

Na medicina humana, a TLS tem demonstrado características de menor invasividade ao paciente, além de fornecer o estadiamento preciso do processo neoplásico. Este aspecto apresenta um diferencial quando comparado à linfadenectomia aleatória, onde o patologista deve examinar os linfonodos sem a devida convicção de que sejam estes os que drenam a neoplasia.

Além disso, com a aplicação da técnica de BLS, a informação está potencialmente concentrada em um ou dois linfonodos, propiciando ao examinador usar métodos detalhados na pesquisa de células tumorais com resultados mais precisos (GIULIANO et al., 2011).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar a acurácia da técnica do linfonodo sentinela na detecção de metástases em cadelas portadoras de carcinomas de mama, sem evidência clínica de metástase à distância.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

**3.2.1.** Verificar a taxa de identificação do LS mediante a administração exclusiva do Azul Patente V.

**3.2.2.** Avaliar a sensibilidade da TLS na detecção de metástases nodais.

**3.2.3.** Verificar a sensibilidade da coloração rotineira de Hematoxilina e Eosina na detecção de micrometástases nodais em comparação com a imuno-histoquímica.

**3.2.4.** Classificar as metástases nodais, de acordo com a sua dimensão, em células isoladas, micrometástases e macrometástases.

### **4. HIPÓTESE DO ESTUDO**

Com base na premissa da disseminação ordenada das células metastáticas ao longo da cadeia linfática, a remoção dos linfonodos sentinelas em cadelas portadoras de carcinomas mamários é eficaz na pesquisa e identificação precoce de micrometástases, não havendo a necessidade de linfadenectomia radical.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1. Animais**

Quarenta e uma cadelas sem restrição quanto à idade, raça ou porte, portadoras de carcinomas de mama, não ulcerados, acometidas por até duas formações malignas, sendo estas localizadas, obrigatoriamente, em uma mesma cadeia mamária, foram selecionadas pelo Departamento de Cirurgia do Serviço Veterinário da ANCLIVEPA/SP, São Paulo, Brasil.

A utilização das cadelas foi condicionada a autorização do proprietário por intermédio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Informado, além do parecer favorável (nº 140/2012-CEUA) do Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, UNESP, Botucatu, São Paulo.

As pacientes foram avaliadas por meio de anamnese, exame físico, laboratorial (hemograma completo, função hepática e renal), raios-X, ultrassom e punção aspirativa por agulha fina dos tumores mamários.

Os critérios de inclusão utilizados exigiam valores de hemograma e bioquímica sérica dentro do intervalo de normalidade segundo Garcia-Navarro (2005) e Bush (2004), respectivamente e ausência de sinais clínicos relacionados a qualquer sistema, e de metástases à distância, pelos exames de imagem.

### **5.2. Avaliação citopatológica das neoplasias**

Todos os tumores foram submetidos à citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) segundo técnica descrita por Raskin & Meyer (2010).

A partir do material coletado, foram confeccionadas quatro lâminas de cada amostra, sendo três fixadas a seco em álcool metílico P.A. por 5 minutos e coradas pelo método de Giemsa e uma submetida à fixação úmida em álcool etílico 95° e posteriormente corada segundo a técnica de Papanicolaou.

As neoplasias foram classificadas sob microscopia óptica nos aumentos de 40X, 100X e 400X em microscópio Olympus® CX41, de acordo com os critérios citomorfológicos nucleares e citoplasmáticos de malignidade descritos por Raskin & Meyer (2010), quais sejam: distribuição e arranjo das células epiteliais, anisocariose, anisocitose, padrão de cromatina, figuras de binucleação e mitose.

Segundo estes critérios, os tumores foram classificados como: neoplasia epitelial benigna ou neoplasia epitelial maligna.

Somente os animais com diagnóstico citológico compatível com neoplasia epitelial maligna foram selecionados para as etapas seguintes.

### **5.3. Procedimento anestésico**

As cadelas foram anestesiadas por equipe técnica qualificada, do Departamento de Anestesia do Serviço Veterinário da Anclivepa/SP, mediante administração endovenosa de Propofol (3 mg/Kg), Fentanil (2mcg/Kg) e Diazepam (0,5 mg/Kg).

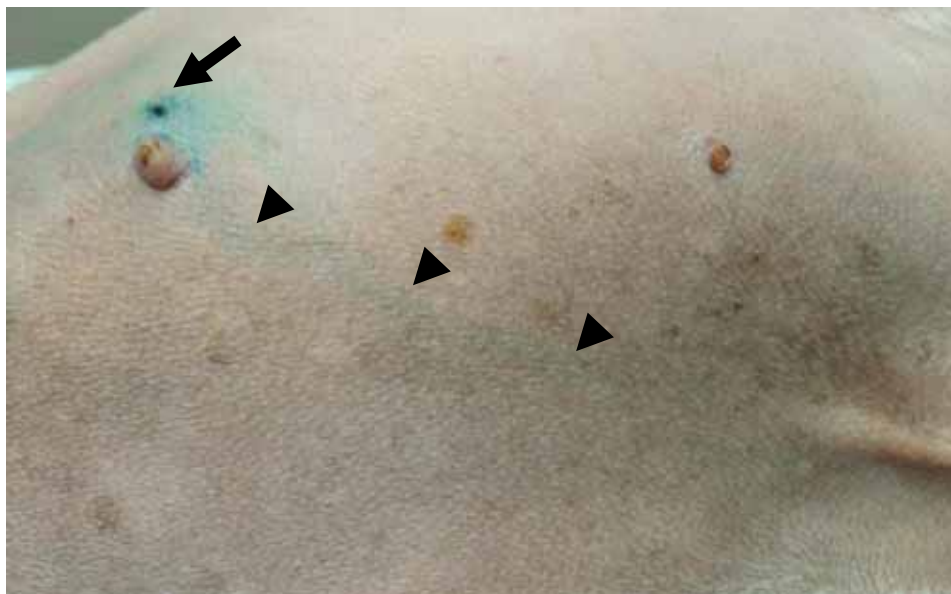
A manutenção anestésica no transoperatório foi realizada com Isoflurano, obedecendo os valores de concentração alveolar mínima próximos de 1,41%, como descritos na literatura especializada (FANTONI & CORTOPASSI, 2009).

### **5.4. Identificação e exérese dos linfonodos sentinela**

Os tumores foram virtualmente divididos em quatro quadrantes iguais. No período pré-operatório foi administrado na região peri-tumoral, de cada quadrante, um quarto do volume total de Azul Patente V 2,5% (Guerbert<sup>®</sup>) considerado para cada tumor.

A dose estabelecida foi de 2 mg/Kg de AP 2,5% por via intradérmica (PINHEIRO et al., 2009). As vias de drenagem linfática de cada tumor foram identificadas por inspeção visual da pele, caracterizadas por marcação azulada dos vasos linfáticos superficiais.

Seguiu-se o trajeto linfático para identificação do sítio anatômico “drenante” correspondente à localização do(s) linfonodo(s) sentinela(s) (LS) (Figura 1). O sítio marcado foi submetido então à incisão simples e identificação direta do LS marcado em azul, seguida de linfadenectomia.



**Figura 1:** Local de injeção do corante vital Azul Patente V 2,5% (Guerbert®) (seta). Observar a região de drenagem, abaixo do local de inoculação, em direção a região subaxilar (cabeça de seta).

Ato contínuo, procedeu-se a mastectomia unilateral, respeitando-se a margem de segurança lateral de 3 cm em associação a linfadenectomia radical dos linfonodos mamários ipsilaterais não marcados pelo AP. Os linfonodos e a cadeia mamária foram identificados, acondicionados separadamente e imersos em formaldeído tamponado 7,5% por 48h.

Todos os procedimentos pré, trans e pós-cirúrgicos foram realizados no Departamento de Cirurgia do Serviço Veterinário da ANCLIVEPA/SP, pela mesma equipe técnica.

A manipulação e administração do corante vital (AP) foi realizada pelo mesmo médico-veterinário, minimizando os vieses oriundos da inoculação.

### **5.5. Acompanhamento e avaliação de morbidade pós-operatória**

Os animais permaneceram internados por um período mínimo de 24 horas, durante o qual foram submetidos aos procedimentos pós-operatórios do Departamento de Cirurgia, recebendo medicação antibiótica, anti-inflamatória e analgésica padrão.

As cadelas retornaram ao hospital nos dias 3, 7, 15 e 30, após o procedimento cirúrgico para avaliação médica, quando se realizou exame físico em busca de alterações comportamentais indicativas de dor ou edema dos membros e da região cirúrgica.

## 5.6. Avaliação macroscópica e histopatológica das neoplasias

As neoplasias foram submetidas à análise macroscópica, onde foram coletadas amostras representativas de cada formação. Em seguida, realizou-se minuciosa inspeção da peça cirúrgica, principalmente no tecido adiposo adjacente, para pesquisa de linfonodos remanescentes.

Todo o material coletado foi mantido em solução tamponada de formaldeído a 7,5% por 48 horas, após o que, foram desidratadas, diafanizadas, incluídas em parafina, seccionadas a 4  $\mu$ m, segundo processamento histotécnico padrão e coradas pela Hematoxilina & Eosina (HE).

Os carcinomas foram classificados em concordância com os critérios descritos por Cassali et al. (2011). O estabelecimento do grau de malignidade neoplásica obedeceu ao proposto por Elston & Ellis (1998) (Tabela 1).

Tabela 1: Graduação de malignidade em Carcinomas Mamários de Cadelas segundo Elston & Ellis (1991).

<b>FORMAÇÃO TUBULAR*</b>	
<b>Acima de 75%</b>	1 ponto
<b>Entre 10-75%</b>	2 pontos
<b>Abaixo de 10%</b>	3 pontos
<b>PLEOMORFISMO NUCLEAR</b>	
<b>Variação discreta</b>	1 ponto
<b>Variação moderada</b>	2 pontos
<b>Variação acentuada</b>	3 pontos
<b>ÍNDICE MITÓTICO**</b>	
<b>0-8 mitoses</b>	1 ponto
<b>9-18 mitoses</b>	2 pontos
<b>Acima de 19 mitoses</b>	3 pontos
<b>GRADUAÇÃO (Somatório)</b>	
<b>Grau I</b>	3-5 pontos
<b>Grau II</b>	6-7 pontos
<b>Grau III</b>	8-9 pontos

\*Considerando-se apenas o componente epitelial.

\*\*Média de mitoses em 10 campos aleatórios de 400X.

## 5.7. Avaliação macroscópica, histopatológica e imuno-histoquímica dos linfonodos

Todos os linfonodos coletados foram inteiramente destinados a análise histopatológica e imuno-histoquímica pela técnica de microtomia seriada descrita por Schuman et al. (2011).



Inicialmente, os linfonodos foram clivados transversalmente em intervalos fixos de 2 mm por toda sua extensão. O número de fragmentos variou de acordo com o tamanho de cada linfonodo. Estes fragmentos foram dispostos em cassetes histológicos, submetidos à desidratação, diafanização e inclusão em parafina (ENSANI et al., 2014).

Em seguida, os blocos foram seccionados em série até a obtenção de 18 lâminas de 4µm. Entre a obtenção de cada secção destinada ao estudo, 10 secções foram descartadas, como preconizado por Schuman *et al.* (2011).

As secções referentes aos números 4, 8 e 12 foram obtidas em duplicata para à investigação imuno-histoquímica (anticorpos CK14 e AE1/AE3). Todas as demais foram coradas pela técnica de Hematoxilina & Eosina.

A pesquisa de células metastáticas nos linfonodos foi realizada sob microscopia óptica nos aumentos de 100X e 400X em microscópio Olympus® CX41, por três experientes patologistas separadamente, quais sejam: Grandi, F.; Costa, L.D.; Zanoni, D.S.. Para tal, as lâminas receberam números aleatórios, garantindo a imparcialidade dos avaliadores.

Os linfonodos foram classificados em positivo (presença de grupos ou células metastáticas isoladas) e negativo (ausência de grupos ou células metastáticas isoladas).

Nos casos dúbios, foi considerado o resultado prevalente, estabelecido por dois dos três patologistas.

A maior área metastática de cada linfonodo foi mensurada utilizando-se freeware ImageJ® e segundo seu tamanho, classificada em macrometástase ( $\geq 2$  mm), micrometástase (0,2-2 mm) ou células isoladas ( $< 0,2$  mm) (SANTOS et al., 2013).

### **5.8. Estudo imuno-histoquímico dos tumores e linfonodos**

Foram utilizados os anticorpos anti-pancitoqueratina (AE1/AE3, camundongo, Dako®, EUA) e anti-citoqueratina 14 (CK14, camundongo, Abcam®, UK), conforme sugerido por Matos *et al.* (2006a).

As secções histológicas (teste e controle) foram dispostas em lâminas silanizadas (Starfrost®) e desparafinadas em estufa a 60°C por 1 hora, seguida de 3 banhos em xileno com duração de 5 minutos cada.

Posteriormente, os cortes foram hidratados em concentrações decrescentes de álcool etílico e lavadas em água corrente. As lâminas foram então submetidas à recuperação antigênica pelo calor em tampão citrato pH 6,0 a 125°C por 30 segundos,

seguido de 90°C por 30 segundos em câmara de pressão Pascal®, Dako Cytomation. Após foram deixadas esfriando a temperatura ambiente por 20 minutos.

As diluições utilizadas para os anticorpos foi de 1:200 para AE1/AE3 e 1:400 para CK14.

As lâminas foram incubadas em câmara úmida *overnight* a 4°C. O sistema de detecção utilizado foi o Novolink® (Novacastra Laboratories, Newcastle, UK) e o cromógeno foi a 3,3´diaminobenzidina (DAB), Dako.

Entre cada uma das etapas supracitadas, os cortes foram vigorosamente lavados com solução de TRIS base pH 7,4. A contracoloração nuclear foi realizada com Hematoxilina de Harris.

## 6. RESULTADOS

Todos os 41 casos estudados apresentaram-se dentro dos critérios de seleção, tendo sido os animais examinados e submetidos à mastectomia radical unilateral e linfadenectomia mamária.

A faixa etária das cadelas estudadas variou de 5 a 14 anos, com média de 10,3 anos.

Dois cadelas do estudo apresentaram formações em mais de uma mama, totalizando 43 tumores.

Em relação à mama acometida, houve predomínio de 72,1% (31/43) dos pares abdominais caudais e inguinais, como demonstra a Tabela 2.

Em nenhum dos animais se observou qualquer efeito colateral ou adverso, bem como qualquer complicação, oriunda da aplicação do corante vital ou da técnica de linfadenectomia.

O tipo histológico mais comum foi o carcinoma em tumor misto (Figura 2) com 86% (37/43) de prevalência, acompanhado pelo carcinoma sólido simples (Figura 3), com 14% (6/43) dos casos.

Em relação à graduação histológica de malignidade, não se verificou em nenhuma das neoplasias avaliadas critérios suficientes para classificação como Grau III, sendo que 74,4% (32/43) foram classificadas como Grau I e 25,6% (11/43) como Grau II.

Durante o estudo foram avaliados 138 linfonodos, com média de 3,4 (2-7 linfonodos) por animal, dos quais 42,7% (59/138) marcaram pelo contraste, com mediana de 1,4 linfonodo sentinela por animal.

Os sítios preferenciais de drenagem foram subaxilar e inguinal ipsilaterais (Tabela 2). Em 13 (31,7%) cadelas, houve drenagem para mais de um sítio, como demonstrado na Tabela 2.

Em todos os casos estudados foi encontrado pelo menos um linfonodo marcado em azul.

Quanto à área de acometimento nodal, 2,4% (1/19) foram classificadas como células isoladas, 63,1% (12/19) como micrometástases e 31,6% (6/19) como macrometástases (Figura 4).

A taxa de animais positivos para metástase nodal pela marcação imuno-histoquímica foi de 46,3% (19/41), sendo que 17 destas foram encontradas em linfonodos sentinela e 2 em linfonodos não sentinela.

A validade da TLS pelo uso exclusivo do azul patente foi determinada mediante a avaliação dos valores de sensibilidade e especificidade, quais sejam 89,5% e 100%, respectivamente, bem como dos valores preditivos positivo e negativo, 100% e 91,7%. A acurácia da TLS foi de 95,7%, com índice Kappa igual a 0,90 e  $p < 0,0001$ .

Quando comparada com a imuno-histoquímica, a coloração pelo HE demonstrou sensibilidade de 94,7% e especificidade igual a 100%, para detecção de focos metastáticos nodais, além de acurácia de 97,5% e valor preditivo positivo e preditivo negativo de 100% e 95,6%, respectivamente.

Tabela 2: Dados referentes às mamas acometidas e aos linfonodos avaliados.

Animal	Mama*	Histotipo	Local drenagem*	Linf. Sentinela	Linf. Não Sentinela	AE1/AE3	CK14
01	MTCau	Misto	SAIL	2	2	+	+
02	MACau	Misto	SAIL	2	2	+	+
03	MACra	Misto	SAIL+IIL	2	2	-	-
04	MTCau	Misto	SAIL+IIL	2	2	-	-
05	MACau	Sólido	IIL	1	2	+	+
06	MIng	Misto	IIL+ICL	2	2	-	-
07	MACau	Misto	SAIL+IIL	3	2	+	+
08	MACau	Misto	SAIL+IIL	2	2	-	-
09	MTCau	Misto	SAIL	1	2	+	+
10	MACra	Misto	SAIL+IIL	3	2	-	-
11	MACau	Misto	IIL	1	2	+	+
12	MTCau	Misto	SAIL	1	1	-	-
13	MIng	Misto	ICL+IIL	2	1	-	-
14	MACau	Sólido	IIL	1	2	+	-
15	MACau	Sólido	IIL	1	2	-	-
16	MACra+M ACau	Misto	IIL+ICL	3	2	+	+
17	MIng	Misto	IIL	1	2	-	-
18	MACau	Misto	IIL	1	3	+	+

19	MIng	Misto	IIL	1	2	+	+
20	MACra	Misto	SAIL+IIL	2	2	-	-
21	MIng	Misto	IIL	1	2	-	-
22	MIng	Misto	IIL	1	2	-	-
23	MTCau	Misto	SAIL+IIL	2	2	+	+
24	MIng	Sólido	IIL	1	2	+	-
25	MIng	Misto	IIL	1	1	-	-
26	MACau	Misto	IIL	1	2	-	-
27	MIng	Misto	IIL	1	2	-	-
28	MACau	Sólido	IIL	1	2	-	-
29	MIng	Misto	IIL	1	1	+	+
30	MACau	Misto	IIL	1	2	-	-
31	MIng	Misto	IIL	1	1	+	+
32	MACau	Misto	IIL	1	1	+	+
33	MACau	Misto	IIL	1	2	-	-
34	MIng	Misto	IIL	1	1	-	-
35	MIng	Misto	IIL	1	2	-	-
36	MIng	Misto	IIL+PIL	2	2	-	-
37	MACra	Sólido	SAIL	2	2	+	+
38	MACra+M Ing	Misto	IIL+ICL	2	1	-	-
39	MACau	Misto	IIL	1	2	+	-
40	MACra	Misto	IIL	2	3	+	+
41	MACau	Misto	IIL+ICL	3	4	+	+
<b>Total</b>	-	-	-	59	79	-	-

\**MTCau*: mama torácica caudal; *MACra*: mama abdominal cranial; *MACau*: mama abdominal caudal; *MIng*: Mama inguinal; *SAIL*: sub-axilar ipsilateral; *IIL*: inguinal ipsilateral; *ICL*: inguinal contra-lateral; *PIL*: poplíteo ipsilateral.

## 7. DISCUSSÃO

A TLS é a grande inovação dos últimos anos no tratamento cirúrgico do carcinoma de mama em mulheres, uma vez que garante procedimentos conservadores e de alta acurácia diagnóstica.

Estudos clínicos comparando a linfadenectomia axilar radical com a TLS indicam tratar-se a última, de um procedimento seguro e eficaz, que minimiza os riscos e maximiza a detecção de metástases nodais, o principal fator preditivo de doença sistêmica (GIULIANO et al., 2011) .

Apesar dos muitos trabalhos e ampla abrangência na medicina humana, a TLS ainda é pouco difundida na medicina veterinária. A partir dos primeiros trabalhos realizados por Pinheiro e colaboradores (2003), que demonstraram a eficácia do método na detecção de linfonodos de mama em cadelas, a técnica tem sido usada experimentalmente na espécie canina, ainda que timidamente, em outros sítios anatômicos, como vulva e estômago (MELO & PINHEIRO, 2010; AQUINO et al., 2012).

A ausência de efeitos adversos e complicações pós-operatórias neste trabalho corresponde ao encontrado na literatura para a mulher, onde são raros os relatos de hipersensibilidade ao contraste vital, com incidência ao redor de 0,34%, demonstrando a superioridade deste corante frente aos demais marcadores (BRENET et al., 2013).

Atualmente são relatadas inúmeras técnicas de marcação, tanto para o homem como para os animais. Rahal e colaboradores (1995) demonstraram o uso de fluoresceína para identificação de canalículos linfáticos, sem, entretanto, marcação dos linfonodos.

A utilização de Carvão Ativado e Tinta da Índia, associado ou não ao AP, também tem sido relatada, porém não existem estudos clínicos que possibilitem definir a sua forma correta de uso, ou que demonstrem a inocuidade destes agentes na espécie canina (ROCHA et al., 2006).

A marcação pela hemossiderina, demonstrada por Pinheiro e colaboradores (2009), surge como uma opção simples e de baixo custo, entretanto, ainda carece de mais testes que possibilitem definir sua dosagem e padronizar a sua utilização rotineira.

A escolha do AP neste estudo baseia-se na existência de trabalhos anteriores evidenciando seu ótimo potencial de marcação, fácil manuseio, ausência de toxicidade e amplo uso na medicina humana (TAKAMARU et al., 2014).

A idade média dos animais estudados corrobora com a maioria dos estudos que indicam maior susceptibilidade entre 9 e 11 anos (TORÍBIO et al., 2012).

Isto se deve, entre outras causas, a maior exposição a fatores ambientais e hormonais desencadeantes, bem como ao aumento do risco na ocorrência de mutações gênicas com o avançar da idade. (SLEECKX et al., 2011).

A alta prevalência de carcinoma em tumor misto também tem sido relatada em levantamentos epidemiológicos, acompanhada por carcinoma sólido e tubular simples. Cassali e colaboradores (2012) referem uma ocorrência de até 66% de tumores mistos dentre as neoplasias mamárias de cadelas.

Apesar da importância desta entidade para a cadela, muitas informações sobre o seu desenvolvimento e biologia ainda permanecem na obscuridade (CASSALI et al., 2011).

Os carcinomas sólidos por sua vez, são tumores comuns nas cadelas e que apresentam comportamento biológico agressivo, por vezes conduzindo a metástase a distancia e com baixa sobrevida livre de doença (MISDORP, 2002; CASSALI et al., 2011).

O índice de marcação dos linfonodos pelo AP e detecção transcirúrgica dos mesmos foi de 100%.

Valor mais alto do que o encontrado por Pinheiro e colaboradores (2003), utilizando a mesma técnica de aplicação. Isto pode ser atribuído ao baixo volume de corante vital inoculado que corresponde, a menos da metade da dose usada em nosso trabalho, não sendo suficiente para que o contraste atingisse os sítios drenantes.

Quando comparado com os valores encontrados para mulheres, a taxa de detecção dos linfonodos da nossa pesquisa apresentou-se similar ou mais alta. Este fato pode ser atribuído ao menor número de linfonodos mamários, na espécie canina (FLEISSIG et al., 2006; GIULIANO et al., 2011; TAKAMARU et al., 2014).

Enquanto a mulher possui em média 23 linfonodos em cada mama, a cadela é detentora de até 8 em cada cadeia. Além disso, a menor quantidade de tecido adiposo sobreposto, bem como o maior volume destes linfonodos possibilita melhores chances de visualização e localização dos mesmos (GIULIANO et al., 2011).

O emprego da mastectomia radical unilateral também permite inspeção macroscópica minuciosa do espécime cirúrgico, auxiliando na visualização de linfonodos milimétricos.

Além disso, se sabe que a presença de tumor de mama determina significativa alteração linfática local, uma vez que a expressão do fator VEGF-c pelas células tumorais resulta em uma reconfiguração dos linfáticos e estabelecimento de novos sítios de drenagem, como pode ser demonstrado em cadelas e mulheres (SCHLOPPMANN et al., 2001; EL-GOHARY et al., 2008; SHIBATA et al., 2012).

Por este motivo também, é possível a marcação de linfonodos contra-laterais ou para mais de um linfonodo, pertencente a mais de uma bacia linfática, como observado em 13 animais do estudo, sendo as mamas abdominais craniais, abdominais caudais e inguinais envolvidas.

Isto tem sido constatado por diversos autores que indicam aumento desta ocorrência na mama abdominal cranial, onde existem anastomoses linfáticas, culminando, inclusive, com o aumento no risco de metástases (PEREIRA et al., 2005; SORENMO, 2011).

Estes achados vão de encontro com os relatados por Szcubiah & Lopuszynski (2011), que referem um padrão clássico de drenagem, com a existência de sítios drenantes pre-determinados, como os linfossomos. Em seu trabalho, entretanto, não houve utilização

de corante ou qualquer outro contraste, utilizando como parâmetro para linfadenectomia apenas a correlação topográfica entre a neoplasia e o linfonodo.

Quando comparado com trabalhos realizados em mulheres, nossa pesquisa encontrou um número de linfonodos sentinela maior do que o descrito na literatura. Isto pode ser justificado pelas interseções de canalículos linfáticos existentes entre as cinco mamas de uma mesma cadeia, propiciando maior área de drenagem e conseqüentemente maior número de linfonodos corados (SORENMO et al., 2011; PATSIKAS et al., 2006).

A presença de células metastáticas em linfonodos não corados também é relatada em mulheres. Estes casos estão associados a estágios tardios de invasão linfática, onde a proliferação destas células bloqueia o fluxo de linfa e impede a chegada do marcador ao sítio de drenagem (Figura 5), como pode ser observado em um dos nossos casos (GOYAL et al., 2006).

A literatura atual não oferece dados relativos a dimensão das áreas de metástase nodal em cães, impossibilitando avaliação comparativa com nossos resultados.

Santos e colaboradores (2013) demonstraram haver significativa diminuição da taxa de sobrevida em cadelas portadoras de metástases nodais, sem referência, entretanto, ao diâmetro da área acometida.

Na medicina humana, estudos recentes tem demonstrado, que a presença de células tumorais isoladas não apresentam significado clínico, ao passo que, pequenos grupos multifocais estão associados com pior prognóstico (AHMED et al., 2013).

A taxa de positividade dos linfonodos apresenta-se superior a relatada na literatura. Trabalhos atuais relatam taxa de positividade de 28,8% (SANTOS et al., 2013).

Segundo Matos e colaboradores (2006a), o baixo índice de metástases nodais está relacionado a falhas na localização dos linfonodos drenantes, bem como na utilização de técnicas histológicas inadequadas para pesquisa metastática, sendo este um dos principais fatores envolvidos na dificuldade de estabelecimento prognóstico de cadelas com câncer de mama.

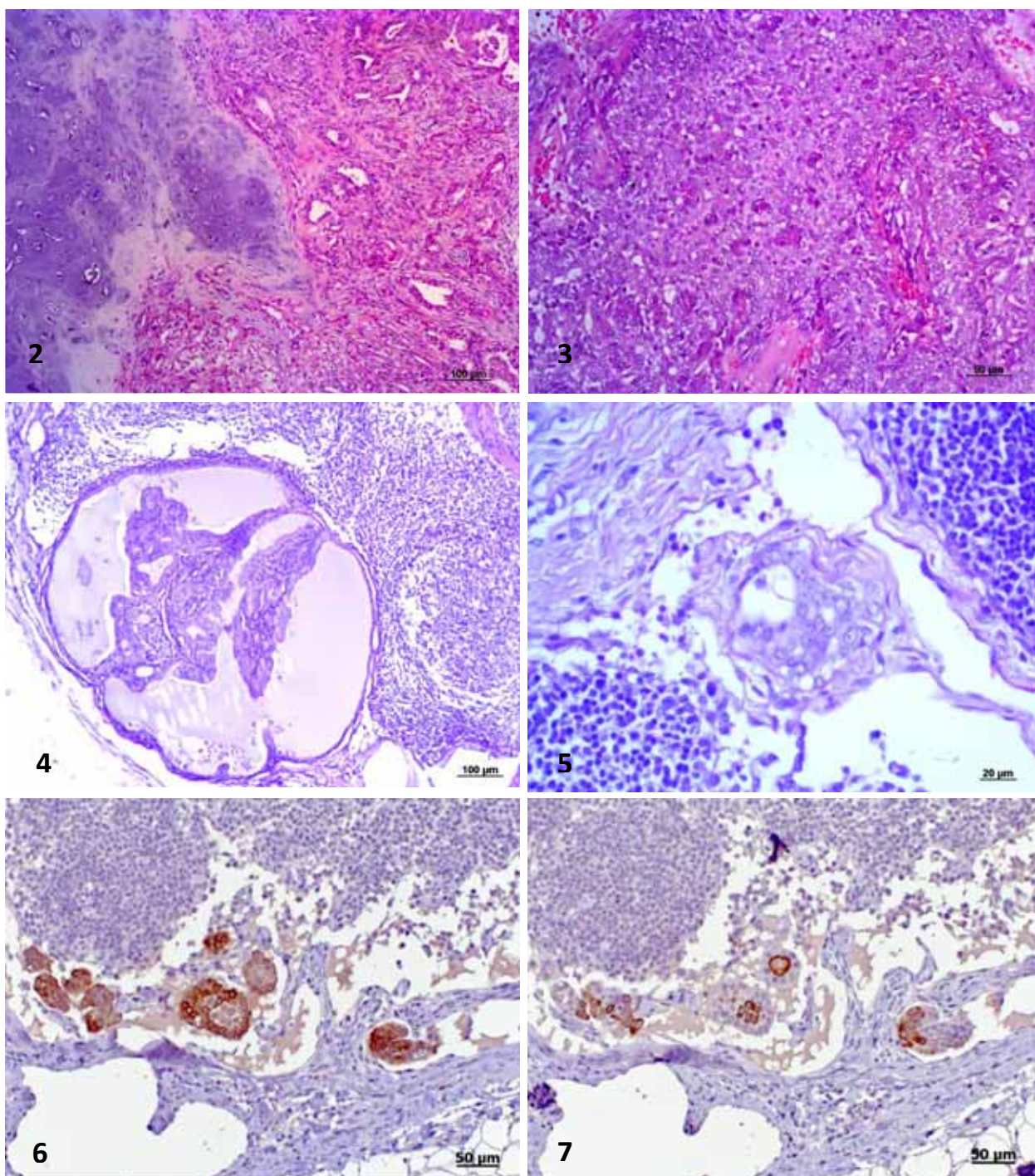
Apesar da inexistência de consenso sobre a melhor técnica de análise anatomopatológica dos linfonodos, a inclusão de toda a peça, associada à utilização de cortes seriados, permite a inspeção de maior área nodal, aumentando a sensibilidade do exame (MARINHO et al., 2008).

Apesar da utilização da imuno-histoquímica na rotina de diagnóstico anatomopatológico ainda ser pontual, nossos resultados demonstram que sua utilização evita a ocorrência falsos-negativos. Tal qual ocorre na medicina humana, alguns trabalhos documentam o

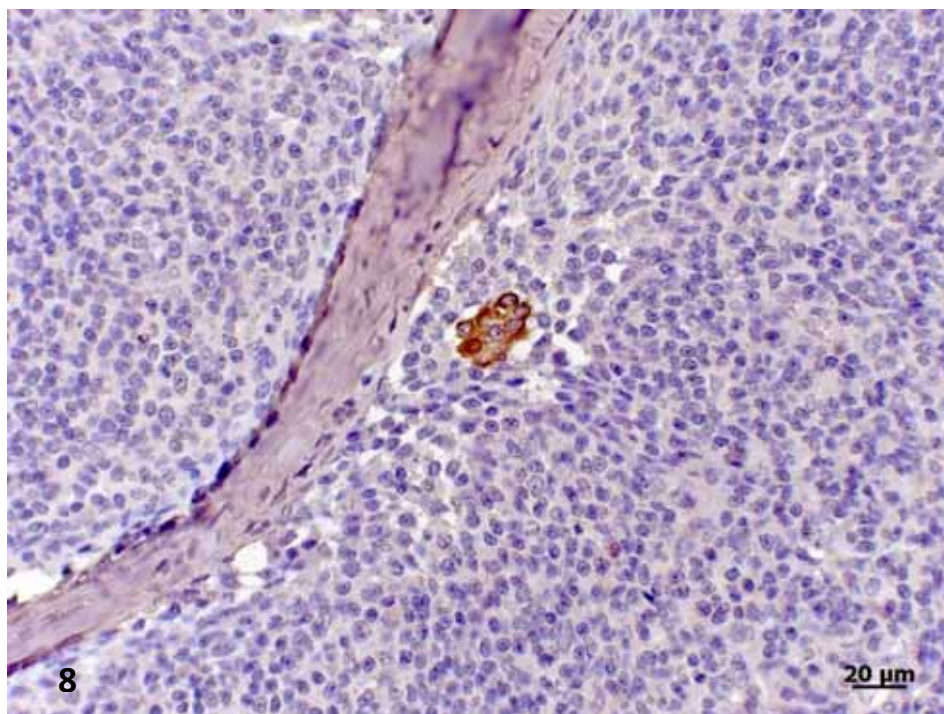
emprego da técnica de imuno-histoquímica para a detecção de metástases ocultas, ou seja, unidades ou pequenos grupos celulares carcinomatosos de difícil visualização nas colorações de rotina (MATOS et al., 2006a) (Figuras 6, 7 e 8).

Vale ressaltar, que não se conhece ainda o valor prognósticos das micrometástases para os cães, sedimentando ainda mais a importância do diagnóstico imuno-histoquímica, a fim de que se acumulem dados precisos que permitam avaliações futuras e forneçam estas informações até então desconhecidas. (SOBIN & WITTEKIND, 2002;. MATOS et al, 2006b).





**Figura 2:** Fotomicrografia evidenciando proliferação neoplásica de células carcinomatosas, acompanhada de proliferação e metaplasia condroide típica (HE, Obj. 10X). **Figura 3:** Fotomicrografia onde se observam células carcinomatosas em arranjo sólido (HE, Obj. 20X). **Figura 4:** Fotomicrografia de linfonodo sentinela com foco de células neoplásicas metastáticas em arranjo cístico-papilar (HE, Obj. 10X). **Figura 5:** Fotomicrografia de linfonodo com êmbolo neoplásico obstruindo a luz de vaso linfático (HE, Obj. 20X). **Figura 6:** Células metastáticas no linfonodo sentinela exibindo marcação forte e específica para AE1/AE2 (DAB, Obj. 20X). **Figura 7:** Mesmo linfonodo da Figura 8, com células metastáticas exibindo marcação forte e específica para CK14 (DAB, Obj. 20X).



**Figura 8:** Pequeno grupo de células metastáticas em arranjo moruliforme (<0,2 mm) e difícil visualização pelas técnicas histoquímicas rotineiras, exibindo marcação forte e específica para AE1/AE3 (DAB, Obj. 40X).

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A TLS, ao que parece, tem um promissor futuro na oncologia veterinária, a exemplo da medicina humana, onde tem se mostrado efetiva na avaliação do status nodal de pacientes com carcinoma de mama.

Mediante a padronização da técnica em cadelas, surgem novas perspectivas diagnósticas e prognósticas que permitirão maior conhecimento da biologia dos vários tipos de carcinoma mamário.

Resta-nos tirar vantagem deste método, permitindo o correto estadiamento clinicopatológico dos nossos pacientes segundo o sistema TNM e contribuindo para tratamentos mais específicos e precoces, portanto, mais eficazes contra doença metastática inicial.

## 9. CONCLUSÃO

- Torna-se evidente, portanto, que a BLS pode prever com eficácia o status nodal da paciente, mediante a utilização de protocolos simples, tal qual ocorre na mulher.
- Houve a identificação de ao menos um linfonodo sentinela em todos os animais estudados, demonstrando a eficácia do Azul Patente V e possibilidade de utilização rotineira da técnica.
- Foram encontrados valores de sensibilidade, preditivo positivo e preditivo negativo similares e por vezes superiores aos descritos na medicina humana, indicando tratar-se, a TLS, de um método seguro no estadiamento nodal de cadelas com carcinomas mamários.
- Apesar da alta sensibilidade encontrada, a utilização exclusiva da coloração rotineira de Hematoxilina & Eosina pode dificultar a identificação de células metastáticas isoladas, conduzindo a diagnósticos falso-negativos.

## 10. REFERÊNCIAS\*

AHMED, S.S.; THIKE, A.A.; IQBAL, J.; YONG, W.S.; TAN, B.; MADHUKUMAR, P.; ONG, K.W.; HO, G.H; WONG, C.Y.; TAN, P.H.; Sentinel lymph nodes with isolated tumour cells and micrometastases in breast cancer: clinical relevance and prognostic significance. *J. Clin. Pathol.*, v. 0, p.1–8, 2013.

AQUINO, J.U., PINHEIRO, L.G.P., VASQUES, P.H.D., ROCHA, J.I.X., CRUZ, D.A., BESERRA, H.E.O., CAVALCANTE, R.V.; Experimental canine model for sentinel lymph node biopsy in the vulva using technetium and patent blue dye. *Acta Cir Bras*, v.27, n.2, 2012.

BESERRA, H.E.O., GRANDI, F., IBANEZ, F.J., ROCHA, N.S., PINHEIRO, L.G.P., Sentinel lymph node identification: the importance of new methodologies and preclinical studies in dogs. *Braz J Vet Pathol*, v.6, n.1, p.5, 2013.

BRENET, O., LALOURCEY, L., QUEINNEC, M., DUPOIRON, D., JAYR, C., ROSAY, H., MAVOUNGOU, P., MONNIN, D., ANCEL, B., MAGET, B., LOUVIER, N., MALINOVSKY, J.M.; Hypersensitivity reactions to Patent Blue V in breast cancer surgery: a prospective multicentre study. *Acta Anaesthesiol Scand*, v.57, n.1, 2013.

BUSH, B.M. Interpretação de Resultados Laboratoriais para Clínicos de Pequenos Animais. 1ª Ed. São Paulo: Roca, p.100-148, 2004.

CABANAS, R.M. An approach for the treatment of penile carcinoma. *Cancer*, v. 39, p.456-66, 1977.

CASSALI, G.D., GOBBI, H., MALM, C., SCHMITT, F.C. Evaluation of accuracy of fine needle aspiration cytology for diagnosis of canine mammary tumours: comparative features with human tumours. *Cytopathology*, v.18, p. 191-196, 2007.

---

\*Referências elaboradas de acordo com o *International Committee of Medical Journal Editors*. *Ann Inter Med*. 1997;16:36-47.

CASSALI, G.D.; LAVALLE, G.E.; DE NARDI, A.B.; FERREIRA, E.; BERTAGNOLLI, A.C.; ESTRELA-LIMA, A.; ALESSI, A.C.; DALECK, C.R.; SALGADO, B.S.; FERNANDES, C.G.; SOBRAL, R.A.; AMORIM, R.L.; GAMBA, C.O.; DAMASCENOS, K.A.; AULER, P.A.; MAGALHÃES, G.M.; SILVA, J.O.; RAPOSO, J.B.; FERREIRA, A.M.R.; OLIVEIRA, L.O.; MALM, C.; ZUCCARI, D.A.P.C.; TANAKA, N.M.; RIBEIRO, L.R.; CAMPOS, L.C.; SOUZA, C.M.; LEITE, J.S.; SOARES, L.M.C.; CAVALCANTI, M.F.; FONTELES, Z.G.C.; SCHUCH, I.D.; PANIAGO, J.; OLIVEIRA, T.S.; TERRA, E.M.; CASTANHEIRA, T.L.L.; FELIX, A.O.C.; CARVALHO, G.D.; GUIM, T.N.; GUIM, T.N.; GARRIDO, E.; FERNANDES, S.C.; MAIA, F.C.L.; DAGLI, M.L.Z.; ROCHA, N.S.; FUKUMASU, H.; GRANDI, F.; MACHADO, J.P.; SILVA, S.M.M.S.; BEZERRIL, J.E.; FREHSE, M.S.; ALMEIDA, E.C.P.; CAMPOS, C.B. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. *Braz J Vet Pathol*, v.4, n.2, p.153-180, 2011.

CASSALI, G.D.; BERTAGNOLLI, A.C.; FERREIRA, E.; DAMASCENO, K. A.; GAMBA, C.O.; CAMPOS, C.B. Canine Mammary Mixed Tumours: A Review. *Veterinary Medicine International*, 2012.

CAVALCANTI, M.F.; CASSALI, G.D. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas – revisão. *Clínica Veterinária*, v.11, n.61, p.56-64, 2006.

DALECK, C.R., FRANCESCHINI, P.H., SANTANA, A.E., MARTINS, M.I.M. Aspectos clínicos e cirúrgicos do tumor mamário canino. *Ciência Rural*, v. 28, p. 95-100, 1998.

EDGE, S.B; BYRD, D.R.; COMPTON, C.C.; American Joint Committee on Cancer, *Cancer Staging Manual*. 7ª ed. New York: Springer, 646 p., 2010.

EGENVALL, F.; BONNETT, B.N.; OHAGEN, P.; HEDHAMMAR, A.; VONEULER, H.; Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Prev Vet Med*. V.69, n.2, 2005.

EL-GOHARY YM, METWALLY G, SAAD RS, ET: Prognostic significance of intratumoral and peritumoral lymphatic density and blood vessel density in invasive breast carcinomas. *Am J Clin Pathol.* 129:578–586, 2008.

ELSTON, C.W., ELLIS, I.O.; Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, v.19, n.5, p.403-10, 1991.

ENSANI, F.; ENAYATI, L.; RAJABIANI, A.; OMRANIPOUR, R.; ALAVI, N.; MOSAHEB, S. Improved Detection of Metastases by Step Sectioning and Immuno-Histochemical Staining of Axillary Sentinel Nodes in Patients with Breast Carcinoma *Asian Pac J Cancer Prev*, v.14, n. 10, p. 5731-5734.

FANTONI, D.T.; CORTOPASSI, S.R.G. Anestesia em cães e gatos. Roca, 2ª Ed., p. 21, 2009.

FLEISSIG, A.; FALLOWFIELD, L.J.; LANGRIDGE, C.I.; JOHNSON, L.; NEWCOMBE, R.G.; DIXON, J.M.; KISSIN, M.; MANSEL, R.E. Post-operative arm morbidity and quality of life. Results of the ALMANAC randomised trial comparing sentinel node biopsy with standard axillary treatment in the management of patients with early breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 95, p. 279–293, 2006.

GARCIA-NAVARRO, C.E.K. Manual de Hematologia Veterinária. São Paulo: Varela, 2ª Ed. p.41-45, 2005.

GATEK, J., VRANA, D., HNATEK, L., BAKALA, J., DUDESEK, B., DUBEN, J., MUSIL, T.; Sentinel node biopsy and neoadjuvant chemotherapy in the treatment of breast cancer. *J Buon*, v17, n.2, 2012.

GIULIANO, A.E, HUNT, K.K., BALLMAN, K.V., BEITSCH, WHITWORTH, P.W., BLUMENERANZ, P.W., LEITCH, A.M., SAHA, S., MORROW, M. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: A randomized clinical trial.; *Journal of American Medical Association*, v. 305, n.6, 2011.

GOLDSCHMIDT, M.; PENÃ, L.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V. Classification and Grading of Canine Mammary Tumors. *Veterinary Pathology*, v. 48, n.1, p. 117-131, 2011.

GOYAL, A.; NEWCOMBE, R.G.; CHHABRA, A.; MANSEL, R.E. ALMANAC Trialists Group. Factors affecting failed localisation and false-negative rates of sentinel node biopsy in breast cancer - results of the ALMANAC validation phase. *Breast Cancer Res Treat.*, v. 99, n.2, p.203-208, 2006.

KARAYANNOPOULOU, M.; KALDRYMIDOU, E.; CONSTANTINIDIS, T.C.; DESSIRIS, A. Histological Grading and Prognosis in Dogs with Mammary Carcinomas: Application of a Human Grading Method. *Journal of Comparative Pathology*, v.133, p. 246-252, 2005.

KELLEY M.C., HANSEN N. & MCMASTERS K.M. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *American Journal of Surgery*, v. 188, p. 49–61, 2004.

KRAG, D.N.; WEAVEN, D.L., ALEX, J.C., FAIRBANK, J.T. Surgical resection and radio localization of the sentinel node in breast cancer using a gamma probe., *Surg. Oncol.*, v.2, p. 335-339, 1993.

MARINHO, V.F.; METZE, K.; SANCHES, F.S.; ROCHA, G.F.; GOBBI, H. Lymph vascular invasion in invasive mammary carcinomas identified by the endothelial

lymphatic marker D2-40 is associated with other indicators of poor prognosis. *BMC Cancer*, v. 29, n. 8, p. 64, 2008.

MATOS, A. J. F.; FAUSTINO, A. M. R.; LOPES, C.; RUTTEMAN, G. R.; GÄRTNER, F. Detection of lymph node micrometastases in malignant mammary tumours in dogs by cytokeratin immunostaining. *Veterinary Record*, v. 158, p. 626-630, 2006.

MATOS, A.J.F., LOPES, C., CARVALHEIRA, J., SANTOS, M., RUTTEMAN, G.R., GÄRTNER, F. E-cadherin expression in canine malignant mammary tumours: Relationship to other clinic-pathological variables. *Journal of Comparative Pathology*, v. 134, p. 182–189, 2006.

MATOS, A.J.F; BAPTISTA, C.S.; GARTNER, M.F.; RUTTEMAN, G.R.; Prognostic studies of canine and feline mammary tumours: The need for standardized procedures. *The Veterinary Journal*, 2012.

MELO, J.R.M., PINHEIRO, L.G.P., Linfonodo sentinela: importância na cirurgia do câncer gástrico e perspectiva da aplicação de um modelo experimental em caninos. *Arq. Bras. Cir. Dig.* V.23, n.3, 2010.

MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN, D.J. Tumors in Domestic animals. Iowa: Blackwell, 4<sup>a</sup> Ed., 800p., 2002.

MORRIS, J.; DOBSON, J. Oncologia em pequenos animais. São Paulo: Roca, 312p., 2007.

OLIVEIRA FILHO, J.C.; KOMMERS, G.D.; MASUDA, E.K.; MARQUES, B.M.F.P.P.; FIGHERA, R.A.; IRIGOYEN, L.F.; BARROS, C.S.L. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 30, n. 2, 2010.

PATSIKAS, M.N.; KARAYANNOPOULOU, E.; KALDRYMIDOY, L.G.; PAPAZOGLU, P.L.; TZEGAS, S.I.; TZIRIS, N.E.; KAITZI, D.G.; DIMITRIADIS,



A.S.; DESSIRIS, A.K. The Lymph Drainage of the Neoplastic Mammary Glands in the Bitch: A Lymphographic Study. *Anat. Histol. Embryol.*, v.35,p. 228–234, 2006.

PEREIRA, C.T.; MARQUES, F.L.N.; WILLIAMS, J.; MARTIN, B.W.; BOMBONATO99M, P.P. Tc-labeled dextran for mammary lymphoscintigraphy in dogs, American College of Veterinary Radiology. Annual Scientific Conference, November 29— December 3, 2005.

PINHEIRO, L.G.P.; MORAES, M.O.; SOARES, A.H.; LOPES, A.J.T.; NAGUÉRE, M.A.S.P.; GONDIM, F.A.L.; BRANDÃO, C.B.; NASCIMENTO, D.C.H.; SOARES, J.P.H; SILVA, J.M.M. Estudo experimental de linfonodo sentinela na mama da cadela com azul patente e Tecnécio Tc99m. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.18, n. 6, 2003.

PINHEIRO, LG.P.; OLIVEIRA FILHO, R.S.; VASQUES, P.H.D.; FILGUEIRA, P.H.O.; ARAGÃO, D.H.P.; BARBOSA, P.M.E.; BESERRA, H.E.O.; CAVALCANTE, R.V. Hemosiderin. A new marker for sentinel lymph node identification. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 24, n. 6, 2009.

PLIEGO, C.M.; FERREIRA, M.L.G.; FERREIRA, A.M.R.; CHAUDONS, M.B.O. Diagnostic quality of mammary nodes biopsy with Super-core II<sup>®</sup> needle of bitches. *Ciência Rural*, v. 38, n.8, 2008.

QUADROS, L.G.A.; GEBRIM, L.H. A pesquisa do linfonodo sentinela para o câncer de mama na prática clínica do ginecologista brasileiro. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, v. 29, n.3, p. 158-164, 2007.

QUEIROGA, F.L.; RAPOSO, T.; CARVALHO, M.I.; PRADA, J.; PIRES, I. Canine Mammary Tumours as a Model to Study. *Human Breast Cancer: Most Recent Finding.*, v. 25, p. 455-466, 2011.

RAHAL, S.C., HOSSNE, W.S., TEIXEIRA, E.M.S.; Uso da fluoresceína na identificação dos vasos linfáticos superficiais das glândulas mamárias em cadelas. *Cienc Rural*, v.25, n.2, 1995.

RASKIN, R.E., MEYER, D.J., Canine and feline cytology: a color atlas and interpretation guide, Missouri: Elsevier, 2<sup>a</sup> Ed., 450 p., 2010.

ROCHA, R.P., ROCHA, E.L.P., CARVALHO, L.V., PINTO, E.B.S., SOUZA, R.P.M.; Distribuição do dextran-99mTc do carvão ativado no linfonodo-sentinela em coelho. Scientia Medica, v.16, n.4, 2006.

SAKORAFAS G.H.; PEROS G. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer: what a physician should know, a decade after its introduction in clinical. Eur. J. Canc. Care, v. 16, p. 318-321, 2007.

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

SCHLOPPMANN, S.F., BIRNER, P., STUDER, P. Lymphatic microvessel density and lymphovascular invasion assessed by anti-podoplanin immunostaining in human breast cancer. Anticancer Res, v.21, 2001.

SCHUMAN, S.; WALKER, G.; AVISAR, E. Processing Sentinel Nodes in Breast Cancer When and How Many? Arch. Surg., v. 146, n. 4, 2011.

SHIBATA, M.A.; AMBATI, J.; SHIBATA, E.; YOSHIDOME, K.; HARADA-SHIBA M.; Mammary cancer gene therapy targeting lymphangiogenesis: VEGF-C siRNA and soluble VEGF receptor-2, a splicing variant. Med. Mol. Morphol., v. 45, n. 4, p. 179-184, 2012.

SHINZATO, J.Y.; MARCACCINI, A.C.P.; BRAGA, A.F.A.; RIBEIRO, A.R.; RUBIO, J.E.M.; SOUZA, J.P.D. Reação anafilática ao corante azul patente durante a biopsia do

linfonodo sentinela em cancer de mama inicial – relato de caso. *Rev Bras Ginecol Obstet.*, v. 28 n.12, p. 728-732, 2006.

SLEECKX, N., ROOSTER, H., KROEZE, E.J.B.V., GINNEKEN, C.V., BRANTEGEM, V.; Canine Mammary Tumours, an Overview. *Reprod Dom Anim*, v.46, 2011.

SOBIN, L.H., WITTEKIND, C.H. *TNM Classification of Malignant Tumours*, 6<sup>a</sup> Ed. UICC, Wiley-Liss: New York, 2002.

SORENMO K.U.; KRISTIENSEN V.M.; COFONE M.A.; SHOFER F.S.; BREEN A.M.; LANGELAND M.; MONGIL C.M.; GRONDAHL A.M.; TEIGE J.; GOLDSCHMIDT M.H. Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Vet. Comp. Oncol.*, v. 7, p. 162-172, 2009.

SORENMO, K.U.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V.; GOLDSCHMIDT, M.H. Development, Anatomy, Histology, Lymphatic Drainage, Clinical Features, and Cell Differentiation Markers of Canine Mammary Gland Neoplasms. *Veterinary Pathology*, v. 48, n. 1, p. 85-97, 2011.

SUAMI, H., YAMASHITA, S., SOTO-MIRANDA, M.A., CHANG, D.W.; Lymphatic territories (lymphosomes) in a canine: an animal model for investigation of postoperative lymphatic alterations. *Plos One*, v.24, n.8, 2013.

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

TAKAMARU, T.; KUTOMI, G.; SATOMI, F.; SHIMA, H.; OHNO, K.; KAMESHIMA, H.; SUZUKI, Y.; OHMURA, T.; TAKAMARU, H.; NOJIMA, M.; MORI, M.; HIRATA, K. Use of the dye-guided sentinel lymph node biopsy method alone for breast cancer metastasis to avoid unnecessary axillary lymph node dissection. *Experimental and Therapeutic Medicine*, v. 7, p. 456-460, 2014.

THALER, S.; HOFMANN, J.; BARTZ-SCHMIDT, K.U.; SCHUETTAUF, F.; HARITOGLOU, C.; YOERUEK, E. Methyl blue and aniline blue versus patent blue and trypan blue as vital dyes in cataract surgery: Capsule staining properties and cytotoxicity to human cultured corneal endothelial cells. *J Cataract Refract Surg.*, v. 37, p. 1147–1153, 2011.

TORÍBIO, J.M.M., COSTA NETO, J.M., BAVIA, M.E.; CARDIM, L.L., MARTINS, E.F., RIBEIRO, L.G.R.; Detecção de aglomerados espaciais de casos de neoplasia mamária em cães no município de Salvador, Bahia. *Cienc Rural*, v.42, n.1, 2012.

TRAPP, S.M.; IACUZIO, A.I.; BARCA JUNIOR, F.A.; KEMPER, B.; SILVA, L.C.; OKANO, W.; TANAKA, N.M.; GRECCO, F.C.A.R.; CUNHA FILHO, L.F.C.; STERZA, F.A.M. Causas de óbito e razões para eutanásia em uma população hospitalar de cães e gatos. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v. 47, n. 5, p. 395-402, 2010.

VERONESI, U., PAGANELLI, G., VIALE, G., GALIMBERTI, V., LUINI, A., ZURRIDA, S., ROBERTSON, C., SACCHINI, V., VERONESI, P., ORVIETO, E., DE CICCO, C., INTRA, M., TOSI, G., SCARPA, D. Sentinel lymph node biopsy and axillary dissection in breast cancer: results in a large series. *J. Natl. Cancer Inst.*, v.91, n. 4, p. 368-373, 1999.

ZENGEL, B., YARARBAS, U., SIRINOCAK, A., OZKOK, G., DENECLI, A.G., POSTACI, H., USLU, A.; Sentinel lymph node biopsy in breast cancer: review on various methodological approaches. *Tumor*, v.99, n.2, p.149-53, 2013.

# ***ANEXO I***

Artigo

Normas da revista

*Trabalho a ser enviado para a revista **Veterinary Pathology***

**METASTASIS OF MAMMARY CARCINOMA IN FEMALE DOGS:  
ASSESSMENT OF THE SENTINEL LYMPH NODE TECHNIQUE**

Hugo Enrique Orsini Beserra<sup>1</sup>, Fabrizio Grandi<sup>1,2</sup>, Noeme Sousa Rocha<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Veterinary Clinics, Service of Veterinary Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Univ. Estadual Paulista – UNESP, Botucatu - SP, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Pathology, Botucatu Medical School, Univ. Estadual Paulista – UNESP, Botucatu - SP, Brazil.

**Corresponding author:** Hugo Enrique Orsini Beserra, [enriqueorsini@gmail.com](mailto:enriqueorsini@gmail.com)

**ABSTRACT**

Recent years have seen the development of extremely accurate techniques for the removal of lymph nodes, such as the Sentinel Lymph Node Biopsy (SLNB) Technique. The technique is based on the staggered progression occurring in the lymphatic drainage of neoplasias, and is currently the main prognostic and diagnostic factor in women suffering from mammary carcinoma. This research aims at assessing the sentinel lymph node biopsy accuracy in female dogs suffering from mammary carcinoma. Forty-one dogs with cytological diagnosis of the tumor were used in the research. After injecting a patent blue V dye, mastectomy was conducted jointly with lymphadenectomy (for both sentinel and non-sentinel lymph nodes). The material was then serially sectioned and microscopically evaluated by routine H&E stain and immunohistochemical study with the markers for pan-cytokeratin AE1/AE3 and myoepithelial cells CK14. The study revealed that 46.3% (19/41) of the animals presented nodal metastasis. The sensitivity and specificity values found for SLNB were respectively 89.5 and 100%, with a kappa coefficient of 0.90 and  $p < 0.0001$ . Therefore, the SLNB technique offers high sensitivity in the early detection of metastases, allowing higher precision in the staging of oncological patients and, therefore, offering higher chances of survival.

**Keywords:** female dog, mammary tumors, metastasis, patent blue, sentinel lymph node

## INTRODUCTION

Nodal metastasis is one of the key prognostic factors in both women and female dogs suffering from mammary neoplasias, being directly related to survival. In addition, they represent the first phase of the tumor's long range spreading.<sup>1</sup> Analysis of the lymph nodes is, therefore, one of the most relevant factors for staging mammary carcinoma in both species.<sup>2</sup>

Despite awareness regarding mammary lymphosomes, which are regional lymph drainage sites, several studies have shown that the presence of tumors may significantly alter the lymphatic direction as animals carrying mammary neoplasia undergo lymphatic reconfiguration, due largely to the presence of prolymphangiogenic cytokines in the tumor's location.<sup>2-4</sup>

In the 1970s, the concept of sentinel lymph node (SLN) was introduced for humans, being defined as the first lymph node in a regional lymph node chain that receives lymph from a primary tumor. It is, therefore, the first to metastasize and its biopsy accurately reveals the nodal "status".<sup>5</sup>

Accordingly, if the sentinel lymph node biopsy (SLNB) does not reveal the presence of cancer cells, the remaining nodes in the chain will also show a negative result, indicating the absence of lymphatic metastasis.<sup>6,7</sup>

The absence of metastasis in the SLN of women carrying mammary carcinoma is in agreement with the results from the remaining regional lymph nodes in almost 100% of the cases.<sup>7</sup>

As it is not necessary to remove the whole lymphatic chain, there is almost no risk of a lymphedema appearing, maintaining the success rates established on the prognosis. In addition, the SLNB allows an early diagnosis of metastases, aiding the therapeutic approach and increasing the treatment's success chances.<sup>9</sup>

Upon the introduction of this procedure in surgical practice, lymph node micrometastases started to be more commonly detected. This happens because the pathologist can focus on inspecting a single or few lymph nodes, resulting on more thorough searches for metastases. In addition, the smaller quantity of material allows for a larger number of sections, which increases the diagnostic efficiency of the technique.<sup>10</sup>

This study aims at assessing the accuracy of the sentinel lymph node biopsy technique in the detection of metastases in female dogs carrying mammary carcinoma.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Patients**

Forty and one female dogs were used for this study with no restrictions regarding age, reproductive status and breed. The patients were evaluated by anamnesis, physical examination, complete blood count, biochemical hepatic and renal profile, chest radiography, abdominal ultrasound and fine-needle aspiration of the mammary tumors. The selection criteria were the absence of abnormalities in the aforementioned examinations and absence of treatments with progestogens (or other hormones).

### **Cytopathological Evaluation of the Neoplasia**

All tumors underwent fine-needle aspiration cytology (FNAC) as per the technique described by Raskin & Meyer.<sup>11</sup>

From the material collected, four microscope slides were mounted for each sample, three of which underwent dry fixation in 95% methyl alcohol for five minutes and stained according to Giemsa's method. The remaining slide was fixated in 95% ethyl alcohol and then stained following Papanicolaou's technique.

The neoplasias were classified by optical microscopy according to the nuclear cytomorphological and cytoplasmatic malignancy criteria described by Raskin & Meyer.<sup>11</sup>

Only animals with a cytological diagnosis of mammary carcinoma were selected for the next stages.

### **Identification of Sentinel Lymph Nodes**

The tumors were divided into equal quarters. During the preoperative, one quarter of the total volume of Patent Blue V 2.5% (Guerbert<sup>®</sup>) was administered in the superficial intradermal peritumoral region at a concentration of 2 mg/kg.<sup>12</sup> After five minutes, the lymphatic drainage system of each tumor was identified by a visual inspection of the skin, characterized by a blue color in the superficial dermal lymphatic vessels. The drainage routes were visualized and anatomical location corresponding to the sentinel lymph node (SLN) was identified (Figure 1). The indicated location underwent a simple incision for direct visualization of the SLN stained in blue. All marked SLNs underwent lymphadenectomy followed by unilateral mastectomy. The sentinel lymph nodes and the mammary lymph node chain were identified and fixated in a 10% formaldehyde solution for 48 hours.



### **Sample Processing**

The representative areas for each tumor were collected according to Cassali *et al.*<sup>13</sup> Thereafter, a thorough inspection of the surgical piece was conducted, focusing on the surrounding adipose tissue and aiming at identifying the remaining lymph nodes.

Initially, the lymph nodes were transversally cleaved in standardized intervals of 2 mm across their whole extension, as per the technique described by Schuman *et al.*<sup>14</sup> The fragments were then set in individual histological cassettes, undergoing dehydration, clearing and paraffin inclusion.<sup>15</sup>

The blocks were then serially sectioned resulting in eighteen 4µm slides. For each section selected for the study, the following 10 sections were discarded, as advocated by Schuman *et al.*<sup>14</sup>

The sections selected for the study were serially numbered from 1 to 15. Sections 4, 8 and 12 were made in duplicate for the immunohistochemical study described below. The remaining sections were stained by Hematoxylin and Eosin.

Under optical microscopy, the lymph nodes were classified as positive (for the presence of metastasized cells or groups of cells) and negative (for the absence of metastasized cells or groups of cells).

The largest metastasized area of each lymph node was measured using freeware ImageJ<sup>®</sup> and, according to its size, classified as macrometastasis ( $\geq 2$  mm), micrometastasis (0.2 – 2 mm) or isolated cells ( $< 0.2$  mm).<sup>16</sup>

### **Immunohistochemical Study of Tumors and Lymph Nodes**

The antibodies anti-pan-cytokeratin (AE1/AE3, mouse, Dako<sup>®</sup>, EUA) and anti-cytokeratin 14 (CK14, mouse, Abcam<sup>®</sup>, UK) were used, as suggested by Matos *et al.*<sup>17</sup>

The histological sections (test and control) were mounted on microscope slides which were silanized (Starfrost<sup>®</sup>) and dewaxed in an oven at 60°C for an hour, undergoing, then, three xylene baths, each lasting for five minutes.

Afterwards, the sections were hydrated in decreasing concentrations of ethyl alcohol and washed in running water. The slides were put through antigen recovering triggered by heat on a citrate buffer (pH 6.0) at 125°C for 30 seconds and then spent 30 seconds at a Dako Cytomation Pascal<sup>®</sup> pressure chamber at a temperature of 90°C. They then cooled at room temperature for 20 minutes.

The dilutions used were 1:200 for AE1/AE3 and 1:400 for CK14. The slides were incubated overnight in a moist chamber at 4°C. The detection system used was Novolink<sup>®</sup> (Novacastra Laboratories, Newcastle, UK) and the chromogen used was 3,3'-diaminobenzidine (DAB), Dako.

Between each of the aforementioned stages, the sections were vigorously washed with TRIS base solution of pH 7.4. The nuclear counterstaining was conducted with Harris' Hematoxylin.

## **RESULTS**

The age group of the dogs in the study varied from 5 to 14 years-old, averaging 10.3 years old.

Two of the dogs in the study presented tumors in more than one mammary gland, totaling 43 tumors.

Regarding the affected mammary gland, the study noticed a 72.1% (31/43) preponderance in the caudal abdominal and inguinal pairs.

None of the animals in the study presented any collateral or adverse effect, nor any complications arising from the dye or from the lymphadenectomy technique.

During the study, 138 lymph nodes were assessed, around 3.4 (2-7 lymph nodes) per animal. Of those, 42.7% (59/138) were marked by a contrasting material, averaging 1.4 sentinel lymph nodes per animal.

The preferential drainage locations were the subaxillary and ipsilateral inguinal regions, occurring in 89% of the cases. In 13 (31.7%) animals, the drainage occurred in more than one location.

In all cases studied, at least one lymph node was found marked in blue.

The rate of animals which presented nodal metastasis by immunohistochemical marking was 46.3% (19/41), of which 17 were found in sentinel lymph nodes and 2 in non-sentinel lymph nodes.

The validity of the SLNB technique with exclusive usage of patent blue was determined by assessing the sensitivity and specificity values, 89.5% and 100% respectively, as well as positive and negative predictive values, respectively 100% and 91.7%. The accuracy of the technique was 95.7%, with a kappa coefficient of 0.90 and  $p < 0.0001$ .

Compared to the immunohistochemical study, the H&E stain presented sensitivity of 94.7% and specificity of 100% for the detection of nodal metastases sources, accuracy

of 97.5%, as well as positive and negative predictive values of 100% and 95.6% respectively.

## DISCUSSION

The SLNB technique is the most important breakthrough of recent years in the surgical treatment of mammary carcinoma in women, as it offers conservative procedures and high diagnostic accuracy.

Clinical studies comparing radical axillary lymphadenectomy to SLNB show that the latter is a safe and efficient procedure, minimizing risks and maximizing the detection of nodal metastases, which is the main predictive factor of systemic diseases.<sup>9</sup>

In spite of several studies and broad usage in human medicine, the SLNB technique is still little known in veterinary medicine. From the first studies conducted by Pinheiro *et al.*<sup>11</sup> which showed the method's efficiency for detecting mammary lymph nodes in female dogs, the technique has been used experimentally in canines, albeit timidly, in other anatomical locations, such as the vulva and the stomach.<sup>19, 20</sup>

The absence of adverse effects and post-operative complications in this study is in agreement to what is shown in the literature concerning human females, in which descriptions of hypersensitivity to the contrasting substance are rare, occurring in about 0.34% of the cases. This fact attests to the superiority of this dye as opposed to other markings.<sup>21</sup>

The preponderance of carcinomas in mixed tumors has also been reported in epidemiologic studies, occurring together with solid and tubular carcinoma. Cassali *et al.*<sup>22</sup> report an occurrence rate as high as 66% for mixed tumors in canine mammary neoplasias (Figure 2)

Despite the importance of this entity to the animal, many pieces of information regarding its development and biology still lie in obscurity.<sup>12</sup>

On the other hand, solid carcinomas (Figure 3) are common tumors in dogs, presenting an aggressive behavior, often spreading the metastasis to distant locations and presenting low chance of survival without the disease.<sup>12, 23</sup>

The use of unilateral radical mastectomy also allows a thorough macroscopic inspection of the surgical specimen, aiding in the visualization of milimetric lymph nodes.

In addition, it is known that the presence of a mammary tumor causes a significant local lymphatic change, as the VEGF-c factor expression by the cancer cells results in a

reconfiguration of lymph nodes and in the establishment of new drainage sites, as shown in both humans and canines.<sup>24-26</sup>

For this reason, it is also possible to mark contralateral lymph nodes or lymph nodes belonging to different lymph node basins, as observed in 13 animals involved in the study, involving the cranial abdominal, caudal abdominal and inguinal mammary glands.

This has been noted by several authors, who point to the increase of this occurrence in the cranial abdominal mammary gland, where there are lymphatic anastomoses, which results in an increased metastasis risk.<sup>27, 28</sup>

These findings are in agreement with reports by Szcubiah & Lopuszynski<sup>29</sup>, which note a classical drainage pattern, possessing predetermined drainage sites, such as the lymphosomes. In their study, however, no dye or contrast was used, considering only the topographic correlation between neoplasia and lymph node as a lymphadenectomy parameter.

When a parallel is made with studies conducted in human females, our research found a larger number of sentinel lymph nodes than what is described in the literature. This can be justified by the intersections of lymphatic canaliculi that exist between the five mammary glands, which results in a larger drainage area and, therefore, in a larger number of stained lymph nodes.<sup>3,28</sup>

The presence of metastasized cells in non-stained lymph nodes is also reported in women. These cases are associated to the later stages of the lymphatic spreading, in which the cellular proliferation blocks the lymphatic flow, making it impossible for the marker to reach the drainage site (Figures 4 and 5), as observed in one of our study's cases.<sup>30</sup>

The observed lymph node positivity rate was higher than the one reported in the literature. Recent studies report a positivity rate of 28.8%.<sup>31</sup>

According to Matos *et al.*<sup>32</sup> the low rate of nodal metastases is related to mistakes in locating the lymph nodes to be drained as well as to using inadequate histological techniques for metastasis research, which is one of the main factors for the difficulty in establishing a prognosis for animals with mammary cancer.

Despite the lack of consensus regarding the best technique for anatomopathological analysis of the lymph nodes, the inclusion of the whole piece, coupled with the serial sections, allows for the inspection of a larger nodal area, which increases the examination's sensitivity.

Even though the usage of immunohistochemical studies in the anatomopathological diagnosis routine is still low, our study show that its use avoids the occurrence of false-positive results. As happens in human medicine, some studies report the use of the immunohistochemical technique for detecting hidden metastases or, in other words, small cancer cell groups or units which are hard to be seen in common stains.<sup>17</sup> (Figures 6 and 7)

It is worth noting that the prognostic value of micrometastases for dogs is still unknown, further solidifying the importance of the immunohistochemical diagnosis so that precise data is gathered for future evaluation, providing hitherto unknown information.<sup>17, 33</sup>

## **CONCLUSIONS**

Therefore, it is evident that the SLNB is capable of efficiently predicting the nodal status of the patient by means of a simple protocol, as happens in humans.

At least one sentinel lymph node was found in each animal participating in the study, which attests to the efficiency of Patent Blue V and to the possibility of frequent use of the technique.

The values found for sensitivity, positive predictive value and negative predictive value were similar, and sometimes superior, to those described in human medicine. This indicates that the SLNB technique is a safe method for nodal staging of female dogs carrying mammary carcinoma.

Despite the high sensitivity found in the study, the exclusive usage of routine Hematoxylin & Eosin stain may make it harder to identify isolated metastasized cells, which leads to false-negative diagnoses.

## **Conflict of interest statement**

None of the authors has any financial or personal relationships that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

## **REFERENCES**

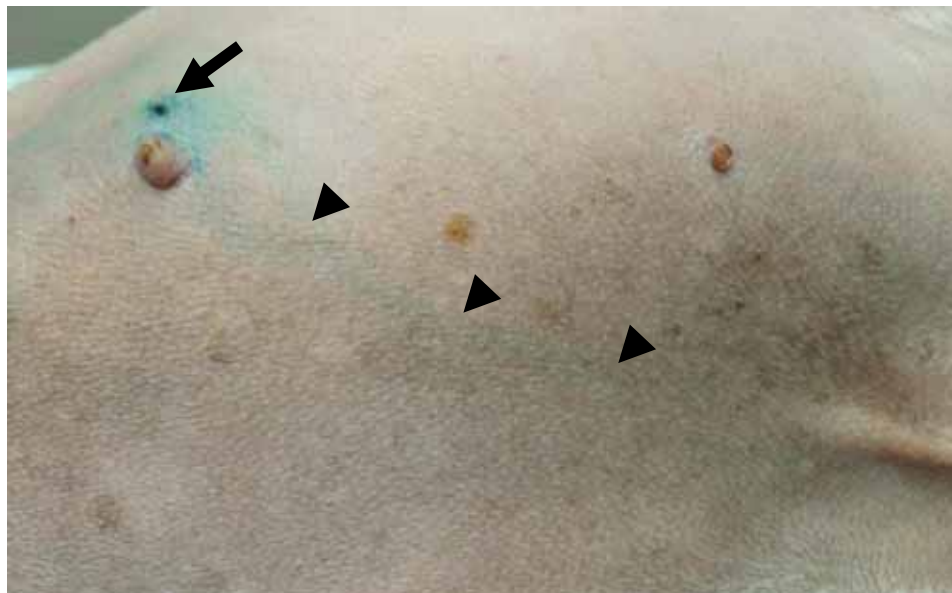
1. Quadros LGA, Gebrim, LH. A pesquisa do linfonodo sentinela para o câncer de mama na prática clínica do ginecologista brasileiro. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 1976; 29(3):158-164.

2. Matos AJF, Baptista CS, Gartner MF, Rutteman GR. Prognostic studies of canine and feline mammary tumours: The need for standardized procedures. *Vet J.* 2012; 193(1):24-31.
3. Patsikas MN, Karayannopolou E, Kaldrymidoy LG, et al. The Lymph Drainage of the Neoplastic Mammary Glands in the Bitch: A Lymphographic Study. *Anat Histol Embryol.* 2006;35(4):228–234.
4. Suami H, Yamashita S, Soto-Miranda MA, Chang DW. Lymphatic territories (lymphosomes) in a canine: an animal model for investigation of postoperative lymphatic alterations. *Plos One.* 2013;24(8):1-9.
5. Cabanas RM. An approach for the treatment of penile carcinoma. *Cancer.* 1977;39(2):456-66.
6. Sakorafas GH, Peros G. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer: what a physician should know, a decade after its introduction in clinical. *Eur J Canc Care.* 2007; 16(4):318-321.
7. Kelley MC, Hansen N, McMasters KM. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Am J of Surg.* 2004;188(1):49-61.
8. Zengel B, Yararbas U, Sirinocak A, et al. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer: review on various methodological approaches. *Tumor.* 2013;99(2):149-153.
9. Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, et al. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: A randomized clinical trial.; *J of Am Med Assoc.* 2011; 305(6):569-575.
10. Veronesi U, Paganelli G, Viale G, et al. Sentinel lymph node biopsy and axillary dissection in breast cancer: results in a large series. *J Nat Cancer Inst.* 1999;91(4):368-373.
11. Raskin RE, Meyer DJ. *Canine and feline cytology: a color atlas and interpretation guide*, Missouri: Elsevier; 2010.
12. Pinheiro LGP, Oliveira Filho RS, Vasques PHD, et al. Hemosiderin: A new marker for sentinel lymph node identification. *Acta Cir Bras.* 2009;24(6):432-436.
13. Cassali GD, Lavallo GE, De Nardi AB, et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. *Braz J Vet Pathol.* 2011;4(2):153-180.
14. Schuman S, Walker G, Avisar E. Processing Sentinel Nodes in Breast Cancer When and How Many? *Arch Surg.* 2011; 146(4):389-393.

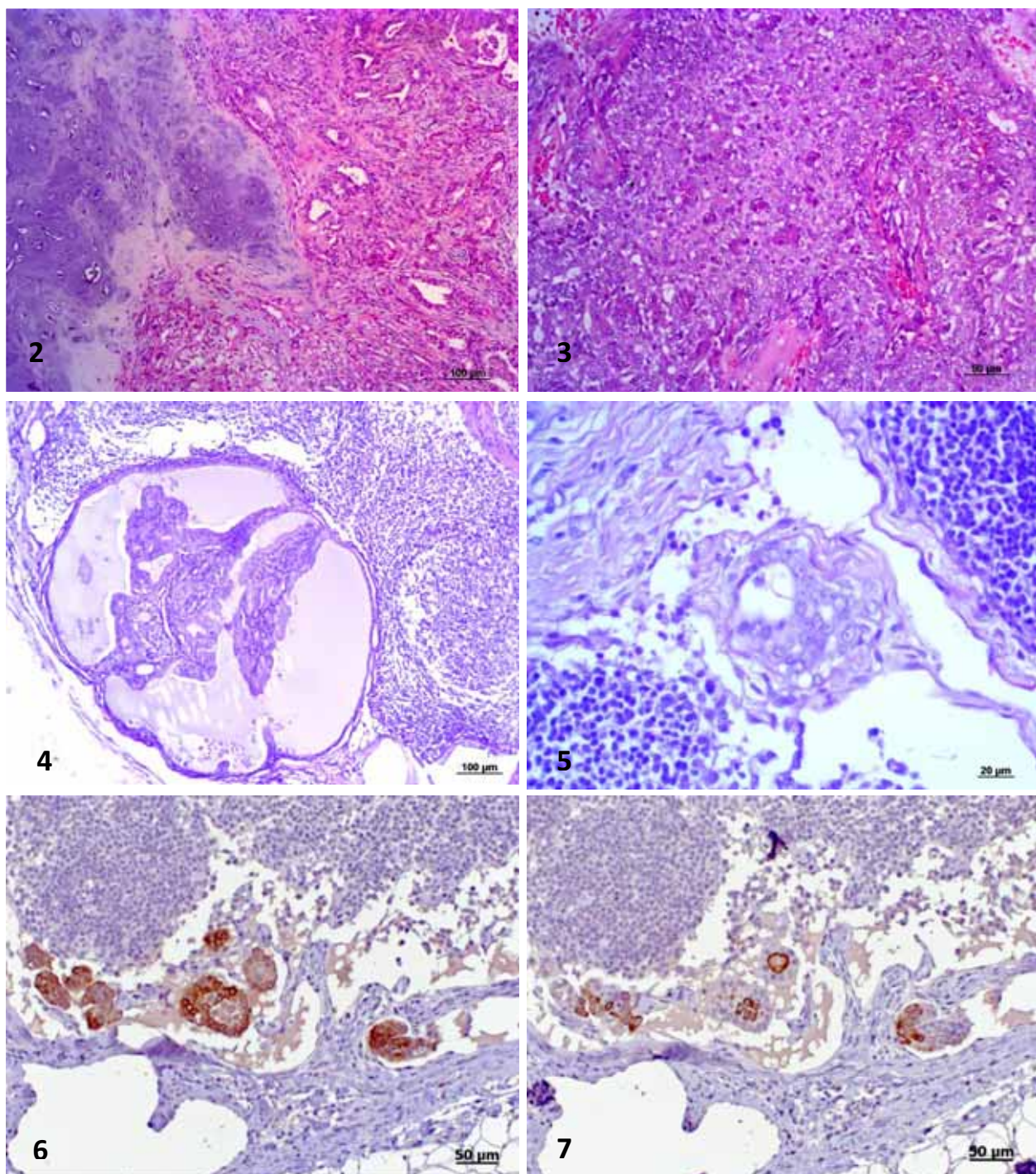
15. Ensani F, Enayati L, Rajabiani A, et al. Improved Detection of Metastases by Step Sectioning and Immuno-Histochemical Staining of Axillary Sentinel Nodes in Patients with Breast Carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(10):5731-5734.
16. Santos AA, Lopes CC, Ribeiro JJ, et al. Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. *BMC Vet Res.* 2013;9(1):1-11.
17. Matos AJF, Faustino AMR, Lopes C, Rutteman GR, Gärtner F. Detection of lymph node micrometastases in malignant mammary tumours in dogs by cytokeratin immunostaining. *Vet Rec.* 2006; 158(1):626-630.
18. Pinheiro LGP, Moraes, MO, Soares AH, et al. Estudo experimental de linfonodo sentinela na mama da cadela com azul patente e Tecnécio Tc99m. *Acta Cir Bras.* 2003;18(6):545-552.
19. Melo JRM, Pinheiro LGP. Linfonodo sentinela: importância na cirurgia do câncer gástrico e perspectiva da aplicação de um modelo experimental em caninos. *Arq Bras Cir Dig.* 2010;23(3):192-195.
20. Aquino JU, Pinheiro, LGP, Vasques PHD, et al. Experimental canine model for sentinel lymph node biopsy in the vulva using technetium and patent blue dye. *Acta Cir Bras.* 2012;27(2):102-108.
21. Brenet O, Lalourcey L, Queinnec M, et al. Hypersensitivity reactions to Patent Blue V in breast cancer surgery: a prospective multicentre study. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2013;57(1):106-111.
22. Cassali GD, Bertagnolli AC, Ferreira E, et al. Canine Mammary Mixed Tumours: A Review. *Vet Med Int.* 2012.
23. Misdorp W. Tumors of the mammary gland. Iowa: Blackwell; 2002.
24. Schloppmann SF, Birner P, Studer P. Lymphatic microvessel density and lymphovascular invasion assessed by anti-podoplanin immunostaining in human breast cancer. *Anticancer Res.* 2001;21(4):2351-2355.
25. El-Gohary YM, Metwally G, Saad RS, et al. Prognostic significance of intratumoral and peritumoral lymphatic density and blood vessel density in invasive breast carcinomas. *Am J Clin Pathol* 2008;129(4):578–586.

26. Shibata MA, Ambati J, Shibata E, et al. Mammary cancer gene therapy targeting lymphangiogenesis: VEGF-C siRNA and soluble VEGF receptor-2, a splicing variant. *Med. Mol. Morphol.* 2012;45(4):179-184.
27. Pereira CT, Marques FLN, Williams J, Martin BW, Bombonato PP. 99M Tc-labeled dextran for mammary lymphoscintigraphy in dogs, *American College of Veterinary Radiology.* 2005.
28. Sorenmo KU, Rasotto R, Zappulli V, Goldschmidt MH. Development, Anatomy, Histology, Lymphatic Drainage, Clinical Features, and Cell Differentiation Markers of Canine Mammary Gland Neoplasms. *Vet Pathol.* 2011;48(1):85-97.
29. Szczubial M, Lopuszynski W. Prognostic value of regional lymph node status in canine mammary carcinomas. *Vet and Comp Oncol.*2011;9(4):296-303.
30. Goyal A, Newcombe RG, Chhabra A, Mansel RE. Factors affecting failed localization and false-negative rates of sentinel node biopsy in breast cancer - results of the ALMANAC validation phase. *Breast Can Res Treat.* 2006;99(2):203-208.
31. Santos AA, Lopes CC, Ribeiro JJ, et al. Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. *BMC Vet Res.* 2013;9(1).
32. Matos AJF, Lopes C, Carvalheira J, et al. E-cadherin expression in canine malignant mammary tumours: Relationship to other clinic-pathological variables. *J of Comp Pathol.* 2006;134(2):182-189.
33. Sobin LH, Wittekind CH. *TNM Classification of Malignant Tumours.* New York; 2002.



**FIGURES AND LEGENDS**

**Figure 1:** Injection site of vital dye Patent Blue V 2.5% (Guerbert ®) (arrow). Note the drain region, below the inoculation site toward sub-axillary region (arrowhead).



**Figure 2:** Photomicrograph showing neoplastic proliferation of carcinomatous cells and typical chondroid metaplasia (HE, 10X Obj). **Figure 3:** Photomicrograph showing carcinomatous cells which are observed in solid arrangement (HE, 20X Obj). **Figure 4:** Photomicrograph of sentinel lymph node metastatic focus of neoplastic cells in papillary cystic arrangement (HE, 10X Obj). **Figure 5:** Photomicrograph of lymph node neoplastic cluster obstructing the lumen of the lymphatic vessel (HE, 20X Obj). **Figure 6:** metastatic cells in the sentinel lymph node showing specific staining for AE1/AE2 (DAB, 20X Obj). **Figure 7:** metastatic cells showing specific staining for CK14 (DAB, 20X Obj).

