

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**Avaliação da expressão de pancitoqueratina para diagnóstico
de micrometástase em linfonodo sentinela de cadelas com
carcinoma mamário**

ALESSANDRA COSTA ARAUJO PALEARI

Botucatu – SP

Abril 2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**Avaliação da expressão de pancitoqueratina para diagnóstico
de micrometástase em linfonodo sentinela de cadelas com
carcinoma mamário**

ALESSANDRA COSTA ARAUJO PALEARI

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Biotecnologia Animal
da Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade Estadual
Paulista como pré-requisito para obtenção
do título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo
Fonseca Alves

Botucatu – SP

Abril 2023

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

Paleari, Alessandra Costa Araujo.

Avaliação da expressão de pancitoqueratina para diagnóstico de micrometástase em linfonodo sentinela de cadelas com carcinoma mamário / Alessandra Costa Araujo Paleari. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Carlos Eduardo Fonseca Alves

Capes: 50501070

1. Cães - Doenças. 2. Mamas - Câncer. 3. Drenagem linfática. 4. Micrometástase de neoplasia. 5. Linfonodo sentinela.

Palavras-chave: AE1/AE3; Drenagem linfática; Micrometástase; Neoplasia mamária.

Nome do autor (a): Alessandra Costa Araujo Paleari

Título: Avaliação da expressão de pancitoqueratina para diagnóstico de micrometástase em linfonodo sentinela de cadelas com carcinoma mamário

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves

Presidente e Orientador

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal FMVZ - UNESP -
Botucatu /SP

Profa. Dra. Maricy Apparicio Ferreira

Membro

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal FMVZ - UNESP -
Botucatu /SP

Profa. Dra. Sabryna Gouveia Calazans

Membro

Médica veterinária autônoma

Data da Defesa: 26 de abril de 2023.

*Dedico a todos os meus pacientes
que lutam bravamente e em silêncio
contra o câncer.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Ivana e Domingos, por me ensinarem a ter coragem e buscar os meus objetivos, independentemente do tempo e idade.

Agradeço ao meu marido Douglas, que sempre me incentivou, me fez sentir capaz de trilhar esse caminho acadêmico, sabendo que era um sonho adormecido, e que é fonte de inspiração de trabalho e persistência.

Agradeço a minha irmã Amanda, que desde muito nova foi fonte de inspiração na área acadêmica, e que me incentivou a seguir esses passos, mesmo sabendo de todas as dificuldades. Não poderia deixar de agradecer a minha sobrinha, e afilhada Sophia, que sempre será o motivo para batalharmos e sermos melhores, e fonte de orgulho. Também à minha sobrinha Jeniffer, por ser forte e amorosa diante da vida.

Agradeço ao meu orientador Carlos Eduardo Fonseca Alves, que é um profissional exemplar em quem me espelho para seguir brilhantemente a área acadêmica e a rotina na oncologia veterinária, além de ser uma pessoa incrível, auxiliando a todos com muito carinho.

Aos integrantes do nosso grupo de pesquisa do Setor de Patologia Animal do Hospital Veterinário da UNESP Botucatu - SP, que foram fundamentais ao meu aprendizado, em especial ao Luíz Guilherme Dercore Benevenuto e Zara Alves Lacerda que me incentivaram e me auxiliaram em meu projeto, sempre com muito carinho e atenção.

Além disso, agradeço a todos os meus pacientes e tutores que entenderam a minha ausência durante a execução do meu experimento e, mesmo assim, confiaram e confiam no meu trabalho.

Por fim, agradeço aos alunos que já passaram por mim, e que me fizeram ser melhor como pessoa e profissional. E que me fizeram estudar para que pudesse responder todas as questões que poderiam surgir.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Educação não transforma o mundo. Educação muda as pessoas, e as pessoas mudam o mundo.”

Paulo Freire

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sinalização dos linfossomos presente em caninos.	4
Figura 2. Técnica do linfonodo sentinela para identificação do linfonodo que drena o tumor	5
Figura 3. Técnica de linfonodo sentinela utilizando azul patente em uma cadela com neoplasia mamária. A: identificação da rede linfática, identificando o linfonodo inguinal superficial como linfonodo sentinela. B: Linfonodo sentinela corado em azul, durante sua remoção cirúrgica.....	7
Figura 4. Presença de micrometástase	10
Figura 5. Esquema da imuno-histoquímica utilizando magenta como cromógeno.	11
Figura 6. Representação da divisão em quadrantes para aplicação do azul patente em 1 quadrante peritumoral (seta).	24
Figura 7. Aglomerado de células positivas para pan-citoqueratina AE1/AE3 (seta).	32
Figura 8. Aglomerado de células positivas para pan-citoqueratina AE1/AE3 (seta).	32

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Características clínicas dos pacientes.....	26
Quadro 2. Amostras submetidas a hematoxilina e eosina (H&E) e a imuno- histoquímica com pancitoqueratina AE1 e AE3, sendo negativo (N) e positivo (P)	28

Sumário

CAPÍTULO 1	14
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Neoplasia mamária	2
2.2 Sistema linfático	3
2.3 Linfonodo sentinela	4
2.4 Remoção do linfonodo sentinela	8
2.5 Diagnóstico.....	9
2.6 Pan-citoqueratina.....	11
3. REFERÊNCIAS	13
CAPÍTULO 2	20
1. INTRODUÇÃO	22
2. MATERIAIS E MÉTODOS	22
2.1 Amostras e grupos.....	23
2.2 Critérios clínicos e cirúrgicos considerados	23
2.3 Avaliação morfológica.....	24
2.4 Imuno-histoquímica.....	25
2.5 Análise estatística.....	26
3. RESULTADOS	26
4. DISCUSSÃO.....	33
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	36
6. REFERÊNCIAS	38

RESUMO

O câncer de mama é a neoplasia mais comum em cadelas, e apresenta alto índice de metástase, sendo a principal causa de morte em pacientes acometidas por neoplasias mamárias. A pesquisa de metástase tem um papel importante para a sobrevida e prognóstico das pacientes. Com isso, a técnica de linfonodo sentinela auxilia na identificação do linfonodo que drena o tumor e avalia possibilidade de metástase. Comumente os linfonodos são avaliados pela técnica de hematoxilina e eosina, e as metástases são identificadas por análise morfológica. Pacientes com neoplasias mamárias podem ter micrometástase em linfonodos, que não podem ser identificadas por técnicas de rotina. Neste contexto, a expressão de pan-citoqueratina (AE1/AE3) por meio da imuno-histoquímica no linfonodo sentinela auxilia na pesquisa de micrometástase. No entanto, o impacto da presença de micrometástases em linfonodos sentinelas de cadelas acometidas por neoplasias mamárias é desconhecido. O objetivo desse estudo foi avaliar a presença de micrometástase em linfonodos sentinelas de cadelas submetidas à mastectomia radical e avaliar seu impacto no prognóstico das pacientes. Foram incluídas nesse estudo, 65 cadelas submetidas à mastectomia radical unilateral, com remoção do linfonodo sentinela. O subtipo histológico mais encontrado foi o tumor misto grau I (19/65), seguido por carcinoma complexo grau I (13/65) e carcinoma tubulopapilar grau II (5/65) e também carcinoma tubular grau I (5/65). Dessas cadelas, 20% (13/65) apresentaram micrometástases em linfonodos sentinelas, detectadas apenas por meio da técnica de imuno-histoquímica. Um achado interessante, foi que a maioria das cadelas com micrometástases, apresentaram tumores de grau I (8/13), seguido por tumores de grau II (3/13). Assim, não houve associação da graduação histológica e a presença de micrometástases. A presente pesquisa identificou uma importante frequência de micrometástases em linfonodos de cadelas acometidas por neoplasia mamária, e cadelas com tumores de grau I foram as mais acometidas.

Palavras-chave: neoplasia mamária, drenagem linfática, AE1/AE3,
micrometástase.

ABSTRACT

Mammary gland tumors (MGT) are the most common neoplasm in intact female dogs and has a high metastasis rate, being the main cause of death in patients with mammary neoplasms. The metastasis research plays an important role in patient survival and prognosis. And, the sentinel lymph node technique increases the identification of the lymph nodes that drains the tumor and evaluates the possibility of metastasis. Commonly, the lymph is evaluated using hematoxylin and eosin techniques, and metastases are identified by morphological analysis. Patients with MGT may have micrometastases in lymph nodes, which cannot be identified by routine techniques. In this context, the expression of pan-cytokeratin through immunohistochemistry in the sentinel lymph node assists in the search for micrometastasis. However, the impact of the presence of micrometastases in sentinel lymph node of female dogs affected by MGT is unknown. The objective of this study was to evaluate the presence of micrometastases in sentinel lymph node of female dogs submitted to radical mastectomy and evaluate their impact on the patients prognosis. In this study, it was included 65 female dogs submitted to radical mastectomy, and sentinel lymph node removal. The most common histological subtype was grade I mixed tumor (19/65), followed by grade I complex carcinoma (13/65) and grade II tubulopapillary carcinoma (5/65) and also grade I tubular carcinoma (5/65). Of these female dogs, 20% (13/65) presented micrometastases in sentinel lymph nodes, detected only through the immunohistochemical technique. An interesting finding was that the majority of bitches with micrometastases had tumors of grade I (8/13), followed by tumors of grade II (3/13) and tumors of grade III (2/13). Thus, there was no association between histological grade and the presence of micrometastases. The present study identified an important frequency of micrometastases in the lymph nodes of bitches affected by MGT, and bitches with grade I tumors were the most affected.

.

Keywords: mammary neoplasm, lymphatic drainage, AE1/AE3, metastasis.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os tumores mamários são as neoplasias mais frequentes em cadelas, e dentre todas as neoplasias mamárias, 50% são malignas e apresentam alto índice de metástase (QUEIROGA, 2002; SLEECKX, 2011). Devido à alta frequência das neoplasias mamárias em cadelas não castradas, e as semelhanças morfológicas entre as neoplasias mamárias de cadelas e mulheres, a cadela é considerada um modelo de estudo para as neoplasias mamárias de mulheres (QUEIROGA, 2011; VALADARES, 2015). Assim, houve um avanço das pesquisas em cadelas, para caracterização desse modelo de estudos, com as cadelas se beneficiando dessas novas pesquisas. Dentre as áreas importantes para as mulheres, ainda pouco explorada para as cadelas, se destaca a utilização da técnica de linfonodo sentinela (DALECK, 2016).

Na Medicina Veterinária, a maioria dos estudos se baseia na realização de linfonodo regional, que está associada à uma divisão anatômica dos linfonodos, baseada em animais hípidos. Em contrapartida, a técnica de linfonodo sentinela se baseia na remoção do linfonodo que faz a drenagem linfática da neoplasia (DALECK, 2016). Os estudos sobre linfonodo sentinela em cães são importantes para algumas neoplasias altamente metastáticas pela via linfática e, com isso, a linfadenectomia seletiva auxilia no estadiamento, prognóstico e seleção de tratamento (BEER, 2017).

A avaliação do linfonodo sentinela através da técnica de hematoxilina e eosina pelo histopatológico é comumente realizado, mas possui limitações. O exame de imuno-histoquímica, por sua vez, pode verificar micrometástases, auxiliando no prognóstico e terapia realizada (PAZ, 2001; TUOHY, 2009; SOREMO, 2013; MEI, 2021).

As metástases em linfonodos diminuem significativamente a sobrevida das cadelas e o impacto das micrometástases na sobrevida de cadelas com neoplasia de mama ainda é incerto (VALADARES, 2015).

Assim, a presente pesquisa pretende selecionar o linfonodo sentinela, sem presença de macrometástase pelo método de hematoxilina e eosina, e

realizar imuno-histoquímica para pan-citoqueratina (AE1/AE3) para identificação de micrometástase.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Neoplasia mamária

Os tumores mamários caninos são os mais frequentes em cadelas não castradas, sendo que sua frequência diminui em regiões onde a ovariectomia é realizada precocemente. No entanto, essa doença na medicina veterinária é comumente diagnosticada na rotina clínica em países que não realizam a castração precoce com frequência (SLEECKX, 2011).

Em torno de 60% dos pacientes já apresentam mais de um nódulo na cadeia mamária quando diagnosticado (BENJAMIM, 1999). Frequentemente, o mesmo paciente pode apresentar nódulos benignos e malignos na mesma cadeia mamária, e os benignos tendo chances de se tornarem malignos com o tempo (SORENMO, 2009).

Os tumores mais comuns em cadelas são adenoma, fibroadenoma e tumor misto benigno em neoplasias benignas e carcinoma simples e carcinoma complexo em neoplasias malignas (KASZAK, 2018).

A hiperplasia lobular (alveolar) pode evoluir para adenoma simples ou complexo, e para adenocarcinoma simples ou complexo, e em fibroadenoma, mioepitelioma e carcinoma de células escamosas. O adenoma complexo pode evoluir para tumor misto benigno e esse para carcinoma ou sarcoma em tumor misto, podendo evoluir para carcinosarcoma. Já a hiperplasia de ducto pode evoluir para papiloma ductal, carcinoma de ducto papilífero, carcinoma ductal e carcinoma anaplásico (BENJAMIM, 1999). No entanto, nem todos os nódulos benignos serão malignos, alguns nódulos permaneceram benignos (SORENMO, 2009).

Pacientes que tiveram câncer de mama apresentam maiores chances de apresentarem nódulos malignos na outra cadeia mamária. Há também uma relação entre o tamanho e a malignidade, tumores grandes apresentam maiores

chances de serem malignos quando comparados a tumores pequenos (SORENMO, 2009).

O tratamento principal para carcinoma mamário consiste em cirurgia e saber da anatomia, e as possibilidades de metástase tornam-se fundamentais (SORENMO, 2009).

2.2 Sistema linfático

O sistema linfático é composto por uma rede de vasos linfáticos que incluem linfáticos iniciais, pré coletores, coletores, troncos e dutos, por órgãos linfóides primários, como o timo e medula óssea, e órgãos secundários como linfonodos, baço, tonsilas e placas de Peyer (HALEY, 2017). Com isso, o papel do linfonodo torna-se uma barreira contra infecções e células neoplásicas (DIETERICH, 2016).

Os linfonodos regionais são compostos por vasos linfáticos que estão interconectados dentro da mesma bacia nodal, mas não no território vizinho. A classificação de linfonodo regional também leva em consideração a localização anatômica, conforme figura 1, que representa os linfossomos, que são os territórios linfáticos, e indicam a cadeia linfática que drena determinada região (SUAMI, 2013).



Figura 1. Sinalização dos linfossomos presente em caninos.

Fonte: Suami, 2013.

Devido à grande variedade do comportamento biológico das neoplasias mamárias, o estudo mais aprofundado dos fatores prognósticos e preditivos necessitam do estudo da drenagem tumoral, sendo necessário a pesquisa do linfonodo sentinela para uma opção segura do tratamento (ANGELIM, 2012; ARENALES, 2014).

2.3 Linfonodo sentinela

Os linfonodos sentinelas são definidos como os primeiros linfonodos de uma bacia linfática regional a drenar a linfa do sítio neoplásico, e são os primeiros a conter células tumorais (DALECK, 2016). As células tumorais podem após a invasão do estroma, penetrar os vasos linfáticos, e podem crescer no tecido

invadido ou se desprender, e assim pelo sistema linfático transportar até a corrente sanguínea. O processo de invasão dessas células tumorais pode provocar metástase do linfonodo regional ou em outros órgãos (NICOLSON, 1993).

A invasão de células neoplásicas nos linfonodos sentinelas provocam várias alterações no microambiente, aumenta o suprimento sanguíneo, e a dilatação do lúmen dos seios linfáticos, formando um nicho pré metastático (DIETERICH, 2016). O conceito de linfonodo sentinela baseia-se no processo metastático, que ocorre em progressão dentro do sistema linfático drenando para um linfonodo específico, e esse tem papel de ser barreira e filtro para a disseminação de células tumorais (BALASUBRAMANIAN, 2011), conforme figura 2.

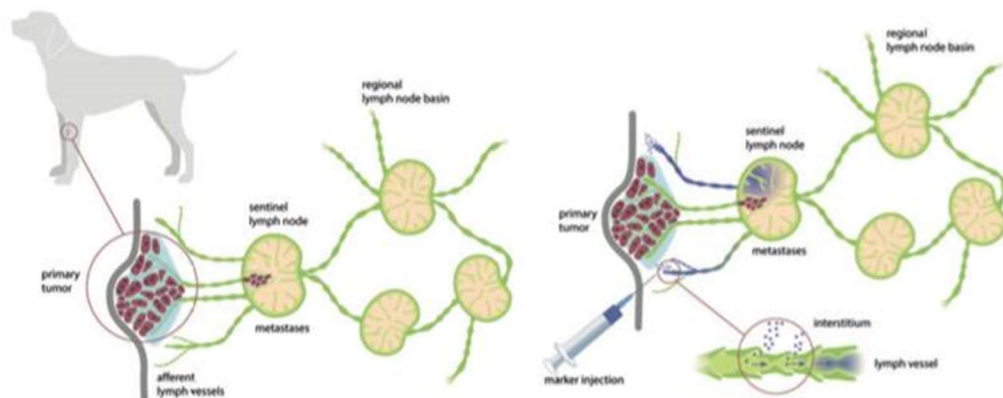


Figura 2. Técnica do linfonodo sentinela para identificação do linfonodo que drena o tumor

Fonte: Beer, 2017.

Com isso, a metástase a distância não deve ocorrer se o linfonodo sentinela não tiver uma carga tumoral. Assim, o linfonodo sentinela reflete o status do leito linfático, embora menos de 0,1% dos pacientes sejam positivos para doença metastática e apresentam o linfonodo sentinela livre de células neoplásicas (BALASUBRAMANIAN, 2011; TURNER, 1997). Os linfonodos sentinelas são mais identificados em mulheres com câncer de mama que em outros tipos tumorais (QIU, 2018).

Contudo, o linfonodo sentinela é o primeiro linfonodo drenante do tumor, porém o linfonodo sentinela é frequentemente diferente do linfonodo anatômico regional, porque a drenagem linfática tumoral é variável e imprevisível (LIPTAK, 2019).

O linfonodo axilar não é facilmente localizado, principalmente quando não está aumentado (CASSALI, 2020). As identificações de biópsia de linfonodos sentinelas em tumores de mama, os linfonodos axilares e inguinais ainda não são rotineiros na clínica e cirurgia de pequenos animais (ANGELIM, 2012). A técnica é um procedimento minimamente invasivo, e é considerado importante na cirurgia oncológica e para avaliar prognóstico (PEREIRA, 2008).

Vários corantes têm sido utilizados para esse fim, como azul patente, azul isossulfano e azul de metileno. Todos têm a característica comum de ligação fraca à albumina, que permite a sua absorção nos vasos linfáticos e delineamento da drenagem linfática dos tumores (QIU, 2018).

A identificação do linfonodo torna-se muito mais fácil quando identificado com azul patente a 2,5 % na dose de 2 mg/kg (CASSALI, 2020). Sendo seguro e eficaz na pesquisa de linfonodo sentinela, embora tenha o custo mais elevado (PINHEIRO, 2003) (Figura 3). Em humanos, é uma técnica realizada há bastante tempo, e tornou-se padrão no câncer de mama até 5 cm (BOUGHEY, 2013). O uso do azul de metileno e azul patente apresentam resultados semelhantes. (PAULINELLI, 2017). Em cadelas, o azul de metileno também vem sendo utilizado, principalmente pelo seu baixo custo. Poucas reações adversas são observadas, como indica o trabalho realizado por Maués, 2016.

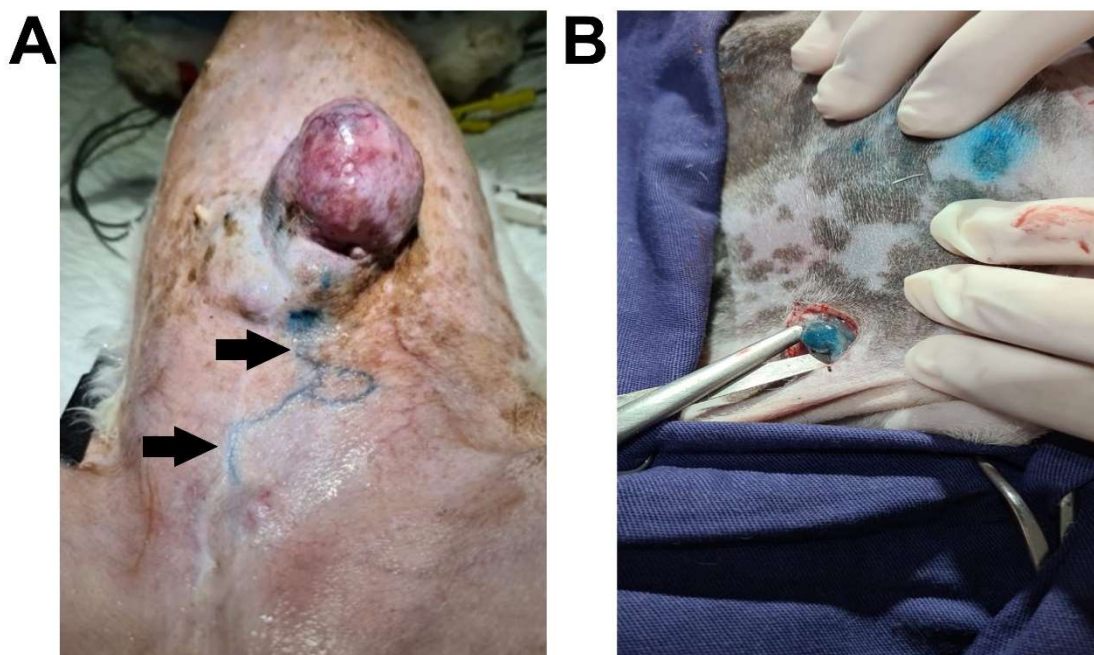


Figura 3. Técnica de linfonodo sentinela utilizando azul patente em uma cadela com neoplasia mamária. A: identificação da rede linfática, identificando o linfonodo inguinal superficial como linfonodo sentinela. B: Linfonodo sentinela corado em azul, durante sua remoção cirúrgica.

Fonte: Elaboração do autor.

A técnica compreende em dividir em 4 quadrantes a dose total e aplicar no subcutâneo peritumoral. Após 5 minutos da aplicação do azul patente, o corante é drenado pelo sistema linfático e é possível visualizar o caminho da mama até o linfonodo sentinela (BESERRA, 2016; CASSALI, 2020; QIU, 2018).

As reações de sensibilidade com o azul patente ocorrem em cerca de 0,1 a 1,1 % dos pacientes, e podem ocorrer pela alta dosagem. Nestes casos, as mucosas, pele e urina podem ficar temporariamente azuladas (CASSALI, 2020). O uso do corante azul patente é seguro, uma vez que não há relatos de grandes reações adversas, sendo observada alteração de saturação de oxigênio transitória, podendo variar de minutos a poucas horas e sem complicações na evolução pós-operatória imediata (VALADARES, 2017; QIU, 2018). Todos os corantes azuis entram na circulação, e podem fazer com que os pacientes pareçam cianóticos e interfira na oximetria de pulso. A excreção é realizada através da urina no pós operatório e assim pode ocorrer a urina de coloração azulada (QIU, 2018).

Além da azul patente V a 2,5% e o do azul de metileno a 1%, têm-se a hemossiderina e outros métodos não colorimétricos (BESERRA, 2016). Na medicina humana, há a linfocintilografia com Tc99m, que consiste em administrar peritumoral um isótopo radioativo. Mas, possui a desvantagem de necessitar de investimento em instalações credenciadas para manejo de materiais radioativos, apesar de ser um método padrão (BESERRA, 2016; QIU, 2018; BALASUBRAMANIAN, 2011). Esta técnica, está tornando-se mais popular na medicina humana, porém na medicina veterinária não está amplamente disponível e, a sonda gama utilizada intraoperatória é um investimento alto (QIU, 2018).

2.4 Remoção do linfonodo sentinela

A remoção do linfonodo sentinela consiste em reconhecer e remover o primeiro linfonodo que drena o fluido linfático do tumor, retirando assim o linfonodo com maior probabilidade de metástase (TUOHY, 2009; SORENMO, 2013). Visto que, o tumor primário é drenado por um linfonodo específico na bacia linfática regional (TURNER, 1997).

O conhecimento da drenagem tumoral durante a cirurgia auxilia no estadiamento mais acurado e, com isso oferece um tratamento mais seguro em região axilar e inguinal, resultando em ressecções mais conservadoras (ANGELIM, 2012; BEER, 2017). Os linfonodos inguinais normalmente são excisados junto com a cadeia mamária, enquanto os linfonodos axilares estão localizados próximos a artérias, veias e nervos (TUOHY, 2009). Com isso, há estudo da corrente linfática de metástase mamária pela técnica do linfonodo sentinela (QUADROS, 2007; TUOHY, 2009).

O linfonodo regional é normalmente excisado nos padrões da drenagem linfática esperada, porém o linfonodo sentinela, quando identificado contém maiores informações sobre o processo tumoral (LIPTAK, 2019).

Considerando as neoplasias mamárias em mulheres, por muitos anos, preconizou-se cirurgias mais agressivas, com esvaziamento linfático radical. No entanto, essa conduta foi revista e atualmente os procedimentos cirúrgicos

instituem terapia loco-regional e sistêmica individualizada, com menor mutilação e melhor qualidade de vida aos pacientes (QUADROS, 2007; QIU, 2018). Em relação as cadelas, a conduta cirúrgica ainda é controversa, com a mastectomia radical unilateral sendo o procedimento mais realizado. Nesta espécie, considerando os trabalhos que realizaram a técnica de linfonodo sentinela, o linfonodo inguinal é o mais frequentemente envolvido (VALADARES, 2015; EL KHATIB, 2011). Porém, trabalhos recentes como de Bianchi (2018), que realizaram exame imuno-histoquímico nos linfonodos sentinelas, verificaram maior índice de metástase em linfonodo axilar do que o inguinal. Assim, considera-se importante a técnica de imuno-histoquímica para uma detecção mais sensível da metástase.

A cirurgia em câncer de mama passou de conceito de cirurgia invasiva para uma cirurgia minimamente invasiva e seletiva, e com o auxílio do linfonodo sentinela e após pesquisa de micrometástases através do exame de imuno-histoquímica (QIU, 2018).

Diante disso, a cirurgia menos invasiva e a detecção do linfonodo sentinela, faz com que o estadiamento linfonodal correto e preciso irá determinar o diagnóstico e a terapia correta e apresentar o verdadeiro prognóstico (BALASUBRAMANIAN, 2011; LIPTAK, 2019).

2.5 Diagnóstico

A pesquisa de micrometástase por exames de imagem radiográfica, ultrassonografia ou tomografia não são eficientes (TUOHY, 2009). Em humanos, o diagnóstico pode ser feito através da citologia, biópsia incisional ou excisional (PAZ, 2001). Na medicina veterinária a biópsia do linfonodo está cada vez sendo mais analisada para detecção de micrometástases ocultas (TUOHY, 2009). Algumas técnicas além do histopatológico com coloração de hematoxilina e eosina estão sendo realizadas para verificação de células tumorais em linfonodos regionais (HANSEN, 2009; NOWIKIEWICZ, 2015).

O estágio do linfonodo tem valor preditivo e prognóstico significativo, sendo que as metástases linfonodais são classificadas de acordo com o volume de células malignas, e são divididas em 3 categorias: aglomerados de células

tumorais (<200 células ou $\leq 0,2$ mm), micrometástase (>0,2 mm e ≤ 2 mm) e macrometástase (>2 mm) (CANAVESE, 2001), conforme figura 4.

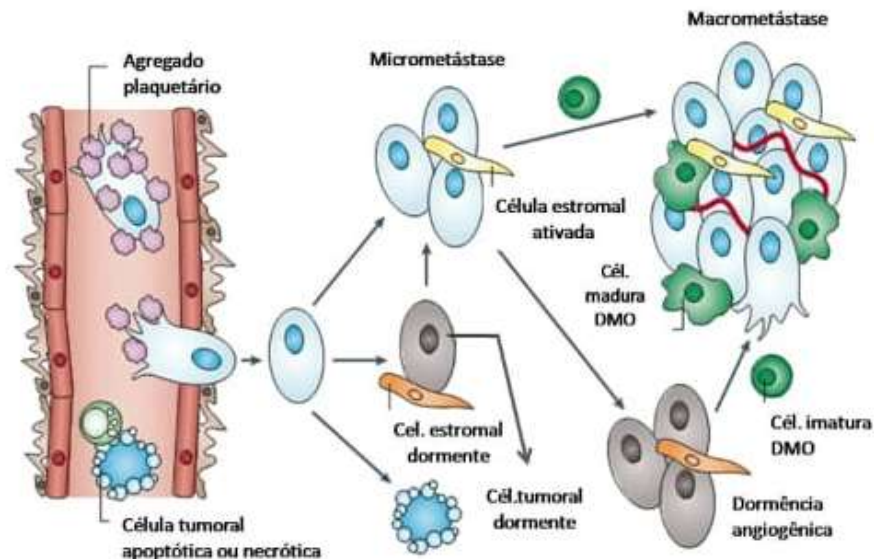


Figura 4. Presença de micrometástase

Fonte: Joyce, 2009.

A disseminação sistêmica de pequeno número de células tumorais podem não ser detectadas por histopatologia e podem ser a grande responsável pela metástase em pacientes inicialmente diagnosticados como negativo (TUOHY, 2009). As dimensões das micrometástases, muitas vezes, não são detectáveis em corte corado com hematoxilina-eosina (MIYAKE, 2001; BESERRA, 2016). A utilização da técnica de imunohistoquímica demonstra maior detecção de células tumorais ocultas, em relação ao histopatológico (COLETO, 2017; PIATO, 2008; MAGALHÃES, 2012; BALASUBRAMANIAN, 2011).

A imuno-histoquímica define-se pelo desenvolvimento de anticorpos específicos para proteínas estranhas ao organismo e por ser altamente específico para cada proteína, os anticorpos são denominados monoclonais. Durante o exame de imuno-histoquímica estes anticorpos monoclonais são adicionados ao tecido, e irão identificar as moléculas da proteína, e para visualização são adicionados corantes (PINHO, 2005), conforme figura 5.

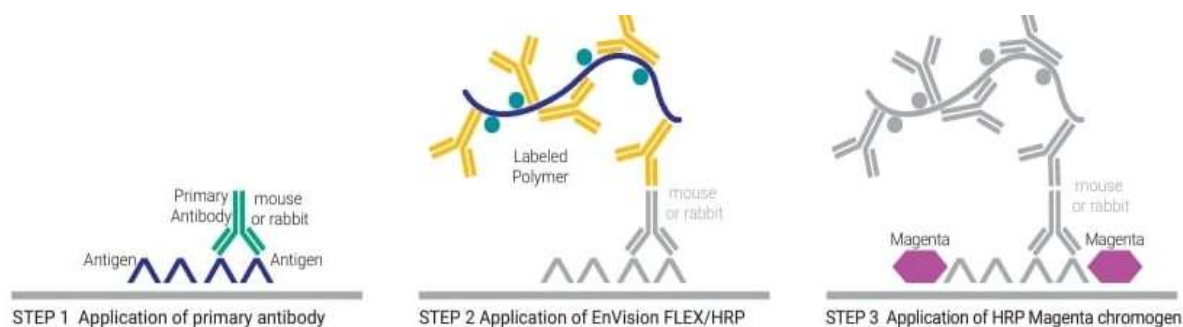


Figura 5. Esquema da imuno-histoquímica utilizando magenta como cromógeno.

Fonte: Datasheet HRP magenta chromogen for Dako omnis, 2018.

Assim, a imuno-histoquímica é utilizada para caracterizar proteínas intracelulares ou superficiais no tecido. Marcadores individuais ou painéis de marcadores podem caracterizar subtipos tumorais, confirmar tecido de origem e distinguir o tumor metastático do tumor de origem (ZAHA, 2014).

A imuno-histoquímica vem sendo realizada na maioria dos laboratórios de anatomia patológica, tornando possível a integração da prática clínica e da biologia molecular, influenciando no melhor tratamento (PINHO, 2005; ZAHA, 2014).

2.6 Pan-citoqueratina

A análise do AE1/AE3 é geralmente considerada uma marcação epitelial confiável, porém devido a expressão variável e de baixo nível de citoqueratina de baixo peso molecular, o uso de um anticorpo de citoqueratina de amplo espectro, como AE1/AE3 sozinho pode não ser tão sensível quando utilizado para carcinomas indiferenciados. No entanto, o objetivo no linfonodo sentinela é a detecção de micrometástase, e assim torna-se o principal anticorpo nessa finalidade em câncer de mama (XU, 2000).

Segundo estudo realizado por Gartner (1999), os anticorpos AE1/AE3 são de marcação epitelial, podem ser encontrados em região alveolar, ductal, proliferação epitelial, mioepitelial, e fracamente em células fusiformes. Portanto, não sendo encontrada essa marcação em linfonodo sem alteração.

A utilização do anticorpo anti-pancitoqueratina (AE1/AE3) pode ser realizada quando o patologista tem dúvidas em relação ao exame de hematoxilina e eosina, ou seja, a imuno-histoquímica pode auxiliar na micrometástase não visível no histopatológico, como também em incerteza ao exame padrão (XU, 2000).

Em trabalho realizado por Zeng (2015), foram utilizado linfonodo sentinela positivo no exame de hematoxilina e eosina, e surpreendentemente foram negativos na imuno-histoquímica para AE1 e AE3. Lembrando que o coquetel AE1 reage com ácido de 56, 5kD, 50kD, 50'kD, 48kD, 40kD, que corresponde à designação de Moll de citoqueratina CK10, CK14, CK15, CK16, CK18 e CK19, respectivamente. Já o coquetel AE3 reage com a subfamília 65-67kD, 64kD, 59kD, 56 kD e 52 kD, que corresponde a CK2, CK4, CK5, CK6 e CK8, respectivamente (MOLL, 1982). Diante disso, foi testado o CK7 e foram positivos, elucidando o AE1/AE3 negativo (ZENG, 2015). Diante disso, ainda há possibilidade de ser um falso negativo mesmo com a utilização do AE1 e AE3, e torna-se necessário exames complementares.

3. REFERÊNCIAS

ANGELIM, J.L., COELHO, M.C.O.C. Linfonodo sentinela: perspectivas no diagnóstico de metástase no câncer de mama em cadelas: revisão. **Medicina Veterinária: Recife**, v.6, n.1, p.24-32, 2012.

ARENALES, A., BASSO, K.M., CALDERÓN, C. Tumor de mama em cães: marcadores prognósticos e imunohistoquímica (COX-2, E-caderina, Receptores hormonais e Ki-67) – revisão de literatura. **PUBVET**, Londrina, v. 8, n. 22, 2014.

BALASUBRAMANIAN, S.P., HARRISON, B.J. Systematic review and meta-analysis of sentinel node biopsy in thyroid cancer. **British Journal of Surgery**, v.98, p.334-344, 2011.

BEER, P., POZZI, A., BLEY, C.R., BACON, N., PFAMMATTER, N.S., VENZIN, C. The role of sentinel lymph node mapping in small animal veterinary medicine: A comparison with current approaches in human medicine. **Veterinary and Comparative Oncology**, v.16, p.178-187, 2017.

BENJAMIN, S.A., LEE, A.C., SAUNDERS, W.J. Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles. **Vet Pathol**. v.36, n.5, p.423– 436, 1999.

BESERRA, H. E. O., GRANDI, F., DUFLOTH, R. M., PINHEIROS, L. G. P., MIOT, H.A., VEXENAT, S.C.O.R., ROCHA, N.S. Metastasis of mammary carcinoma in bitches: Evaluation of the sentinel lymph node technique. **Advanced Breast Cancer Research**, v. 5, p. 58-65. 2016.

BIANCHI, S.P., GOMES, PAVARINI, C.S.P., MOMBACH, V.S., SANTOS, F.R., VIEIRA, L.C., OLIVEIRA, L.O., CONTESINI, E.A. Linfonodo axilar como sentinela de neoplasia mamária em cadelas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.38, n.4, p.692-695, 2018.

BOUGHEY, J.C.; SUMAN, V.J.; MITTENDORF, E.A.; AHRENDT, G.M.; WILKE, L.G.; TABACK, B.; LEITCH, M.; KUERER, H.M.; BOWLING, M.; FLIPPOMORTON, T.S.; BYRD, D.R.; OLLILA, D.W.; JULIAN, T.B.; McLAUGHLIN, S.A.; McCALL, L.; SYMMANS, F.; LE-PETROSS, H.T.; HAFFTY,

B.G.; BUCHHOLZ, T.A.; NELSON, H.; HUNT, K.K. Sentinel lymph node surgery after neoadjuvant chemotherapy in patients with node-positive breast cancer. **The ACOSOG Z1071 (Alliance) clinical trial. JAMA**, v. 310, n. 14, p. 1455-1461, 2013.

CANAVESE, G., GIPPONI, M., CATTURICH, A., VECCHIO, C., TOMEI, D., NICOLÓ, G., CARLI, F., SPINA, B., BONELLI, L., VILLA, G., BUFFONI, F., BIANCHI, P., AGNESE, A., MARIANI, G. Technical issues and pathologic implications of sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer patients. **Journal of surgical oncology**, v.77, p.81-87, 2001.

CASSALI, G.D., JARK, P.C., GAMBA, C., DAMASCENO, K.A., LIMA, A.E., DE NARDI, A.B., FERREIRA, E., HORTA, R.S., FIRMO, B.F., SUEIRO, F.A.R., RODRIGUES, L.C.S., NAKAGAKI, K.Y.R. Consensus Regarding the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine and Feline Mammary Tumors - 2019. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.13, n.3, p.555 – 574, 2020.

COLETO, A.F. **Metástases de carcinomas mamários em linfonodos de cadelas: variáveis clinicopatológicas e estudo imunohistoquímico.** (Tese mestrado)- Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, p.65, 2017.

DALECK, C.R.; DE NARDI, A.B. **Linfonodo sentinela.** Oncologia em cães e gatos. 2ª ed. Editora Roca Rio de Janeiro, p. 129 -132, 2016.

DATASHEET HRP MAGENTA CHROMOGEN FOR DAKO OMNIS, Simply revolutionary 'red', Agilent Dako, 2018.

DIETERICH, L.C., DETMAR, M. Tumor lymphangiogenesis and new drug development. **Adv Drug Deliv Rev**, v.99, p.148-160, 2016.

EL KHATIB, E.M., PIRES, P.F.T.A., LIMA, A.F.K.T., REPETTI, C.S.F., FRANCO, R.P., HATAKA, A. Uso do azul de metileno na identificação do linfonodo sentinela em cadelas com neoplasias mamárias. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v.18, n.1. p.60-65, 2011.

GARDNER, H.L., FENGER, J.M., LONDON, C.A. Dogs as a model for cancer. **Annu Rev Anim Biosci.**, v.4, p.199-222, 2016.

HALEY, P. The lymphoid system: a review of species differences. **Journal of Toxicologic Pathology**, v.30, p.111-123, 2017.

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

JOYCE, J.A., POLLARD, J.W. Microenvironmental regulation of metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v.9, 2009.

KASZAK, I., RUSZCZAK, A., KANAFKA, S., KACPRZAK, K., KRÓL, M., JURKA, P. Current biomarkers of canine mammary tumours. **Acta Vet Scand**, p. 60-66, 2018.

LIPTAK, J.M., BOSTON, S.E. Nonselective lymph node dissection and sentinel lymph node mapping and biopsy. **Vet Clin Small Anim**, v.49, p.793-807, 2019.

MAGALHÃES, G.M., Silveira, A.C.T., MUNARI, D.P., ALESSI, A.C. Behavior of CD44 receptors in mammary tumors of dogs. **Open Journal of Veterinary Medicine**, v.2, p.8-51, 2012.

MAUÉS, T., ISRAEL, C.B., FERREIRA, M.L.G., FERREIRA, A.M.R. Uso do corante azul de metileno a 2% na localização do linfonodo axilar em cadelas (*Canis familiaris* – Linnaeus, 1758). **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 53, n. 1, p. 32-38, 2016.

MEI, C., XIN, L., LIU, Y., LIN, J., XIAN, H., ZHANG, X., HU, W., XIA, Z., WANG, H., LYU, Y. Establishment of a new cell line of canine mammary tumor CMT-1026. **Frontiers in Veterinary Science**, v.8, October, 2021.

MIYAKE, Y., YAMAMOTO, H., FUJIWARA, Y., OHUE, M., SUGITA, Y., TOMITA, N., SEKIMOTO, M., MATSUURA, N., SHIOZAKI, H., MONDEN, M. Extensive micrometastases to lymph nodes as a marker for rapid recurrence of colorectal

cancer: a study of lymphatic mapping. **Clinical Cancer Research**, v.7, p.1350-1357, 2001.

NICOLSON, G.; FIDLER, I. **Concepts y mecanismos relacionados com las metástasis del cáncer de mama**. In: BLAND, K. I.; COPERLAND, E. La Mama. Buenos Aires: Panamericana, 1993.

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

PAULINELLI, R.R., FREITAS-JUNIOR, R., RAHAL, R.M.S., OLIVEIRA, L.F.P., VILELA, M.H.T. MOREIRA, M.A.R., ALVES, K. L., PELEJA, M.B., RESENDE, T.C.C. A prospective randomized trial comparing patent blue and methylene blue for the detection of the sentinel lymph node in breast cancer patients. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.63, n.2, p. 118-123, 2017.

PAZ, W.A., PAIM, S.P., MELLO, G.L., RANGEL, K.K., CHRISTO, R.C., GONÇALVES, R., SILVA, M.E., BARROSO, A.A., SOUZA, A.F. Biopsia de linfonodo sentinela- Experiência clínica. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.43, n.3, p.303-308, 2001.

PEREIRA, R.J., OLIVEIRA FILHO, R.S., ZULIANI, C.R., VIDEIRA, R.V.S, SIMÕES, M.M, ENOKIHARA, S., PINHEIRO, L.G.P. Solução de carvão ativado e corante vital para a biópsia de linfonodo sentinela em ratos. **Einstein**, v.6, n.4, p. 463-466, 2008.

PIATO, J.R.M., PINCERATO, K.M., GOMES, V.C.S., CARVALHO, F.M., PINHEIRO, W.S., BARACAT, E.C. Metástase oculta em linfonodo sentinela no câncer de mama em estádios iniciais. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.30, n.9, p.432-436, 2008.

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.N., SOARES, J.P.H. MENESES E SILVA, J.M. Estudo experimental de linfonodo

sentinela na mama da cadela com azul patente e Tecnécio Tc99m1. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.18, n.6, 2003.

PINHO, M. DE S. L. Imunohistoquímica: O Estudo da Biologia Molecular ao Alcance de Todos. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 25, n. 2, 2005.

QIU, S.Q., ZHANG, G.J., JANSEN, L., VRIES, J., SHRODER, C.P., VRIES, E.G.E., DAM, G.M.V. Evolution in sentinel lymph node biopsy in breast câncer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 123, p.83-94, 2018.

QUADROS, L.G.A.; GEBRIM, L.H. A pesquisa do linfonodo sentinela para o câncer de mama na prática clínica do ginecologista brasileiro. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n. 3, p. 158-164, 2007.

QUEIROGA, F. L., LOPES, C. Tumores mamários caninos – Novas perspectivas. In: CONGRESSO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS. **Oeiras**, p. 183-190, 2002.

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. **In vivo**, v.25, p. 455-466, 2011.

SCHIFFMAN, J.D., BREEN, M. Comparative oncology: whats dogs and other species can teach us about humans with cancer. **The Royal Society Publishing**, Jun, 2015.

SLEECKX, N., ROOSTER, H., KROEZE, E.V., GINNEKEN, C.V., BRANTEGEM, L.V. Canine Mammary tumours, an overview. **Reproduction in Domestic Animals**, v.46, p. 1112-1131, 2011.

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

SORENMO, K.U., WORLEY, D.R., GOLDSCHMIDT, M.H. **Tumors of the mammary gland.** In: WITHROW S J, VAIL D M & PAGE R L. Small Animal Clinical Oncology. 5ª ed. Editora Elsevier, p. 538-556, 2013

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.8, 2013.

TURNER, R.R., OLLILA, D.W., KRASNE, D.L., GIULIANO, A.E. Histopathologic validation of the sentinel lymph node hypothesis of breast carcinoma. **Annals of surgery**, v.226, n.3, p.271-278, 1997.

TUOHY, J.L., MILGRAM, J., WORLEY, D.R., DERNELL, W.S. A review of sentinel lymph node evaluation and the need for its incorporation into veterinary oncology. **Veterinary and Comparative Oncology**, v.7, n.2, p. 81-91, 2009.

VALADARES, F.D., **Pesquisa do linfonodo sentinela em cadelas portadoras de tumor de mama.** (Tese mestrado)- Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, p.43, 2015.

VALADARES, F.D., **O processo diagnóstico na abordagem das cadelas com tumor de mama atendidas no hospital veterinário da ufv: palpação linfonodal x pesquisa do linfonodo sentinela.** (Tese doutorado)- Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, p.53, 2017.

ZAHA, D.C., Significance of immunohistochemistry in breast cancer. **World J Clin Oncol**, v. 5, n.3, p.382-392, 2014.

HIPÓTESE

As micrometástases em linfonodos sentinelas são de difícil detecção pelas técnicas de rotina, e um grupo importante de pacientes com tumores de mama apresentam micrometástases ao diagnóstico.

OBJETIVOS

Gerais

Avaliar a expressão da pancitoqueratina AE1/AE3 para diagnóstico de micrometástase em linfonodo sentinela em carcinoma mamário.

Específicos

- Avaliar o linfonodo sentinela em carcinoma mamário;
- Avaliar a pancitoqueratina AE1/AE3 em linfonodo sentinela;
- Comparar o método de pesquisa de metástase através da hematoxilina e eosina e imuno-histoquímica;

CAPÍTULO 2

Artigo Científico a ser submetido para a revista "Veterinary and Comparative Oncology" (FI: 2.385)

**Evaluation of pan-cytokeratin expression for the diagnosis of
micrometastasis in sentinel lymph node in mammary gland tumors**

1. INTRODUÇÃO

Os tumores mamários são as neoplasias mais comuns em cadelas não castradas. Aproximadamente 50% desses tumores são malignos, e 25% podem formar metástases à distância, aumentando o risco de vida e contribuindo para um prognóstico desfavorável (LIU, 2014).

A heterogenicidade da glândula mamária e os subtipos de tumores de câncer de mama torna a doença de difícil prevenção e tratamento (SPRANG, 2017). Um dos principais problemas no tratamento do câncer de mama é a recorrência do crescimento tumoral e a descoberta de metástase (RANGEL, 2016), sendo a causa mais frequente de morte nestes pacientes (KOCH, 2020).

A análise dos linfonodos no câncer de mama é um dos fatores mais importantes no estadiamento. Porém, a presença de tumores pode alterar a direção linfática (MATOS, 2012). Com isso, a eficiência da técnica do linfonodo sentinela através do azul patente atesta o primeiro linfonodo a drenar o tumor de mama, e contém informação importante sobre a gravidade do câncer (BESERRA, 2016).

A técnica do linfonodo sentinela é um avanço importante no tratamento cirúrgico mamário, pois direciona a realização de procedimentos conservadores e melhor diagnóstico de metástase (MATOS, 2006).

O estadiamento dos carcinomas mamários é importante para instituir tratamento correto, principalmente quando há metástase, e a quimioterapia adjuvante é necessária (CHOCTEAU, 2019; SOULTANI, 2016).

A avaliação utilizando biomarcadores possibilita diagnósticos clínicos, opções de tratamento e prognóstico. As células tumorais circulantes podem atuar como bons biomarcadores do potencial metastático (KASZAK, 2018).

Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar a expressão da pancitoqueratina AE1/AE3 para diagnóstico de micrometástase em linfonodo sentinela em carcinoma mamário.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostras e grupos

Foram incluídas nessa pesquisa as amostras de carcinoma mamário de cadelas e o respectivo linfonodo sentinela de pacientes de clínicas particulares na cidade de Botucatu e Bauru, da Universidade Paulista – UNIP, da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS e da Universidade Estadual Paulista – UNESP. Para obtenção das amostras de bloco de parafina foi solicitado autorização do Comitê de Ética de Utilização de Animais – UNESP Botucatu (Protocolo CEUA 0192/2022).

2.2 Critérios clínicos e cirúrgicos considerados

As cirurgias foram realizadas baseada na citologia aspirativa da mama com nódulo, e após a cirurgia foi confirmado o diagnóstico em histopatológico através de hematoxilina e eosina. Durante o procedimento cirúrgico foi realizada a técnica de linfonodo sentinela, que consiste em utilizar o azul patente, na dose de 2 mg/kg peritumoral, dividido o volume total do azul patente em 4 quadrantes (figura 6), e posterior espera de no mínimo 15 minutos para que o corante pudesse percorrer o caminho até o linfonodo sentinela.

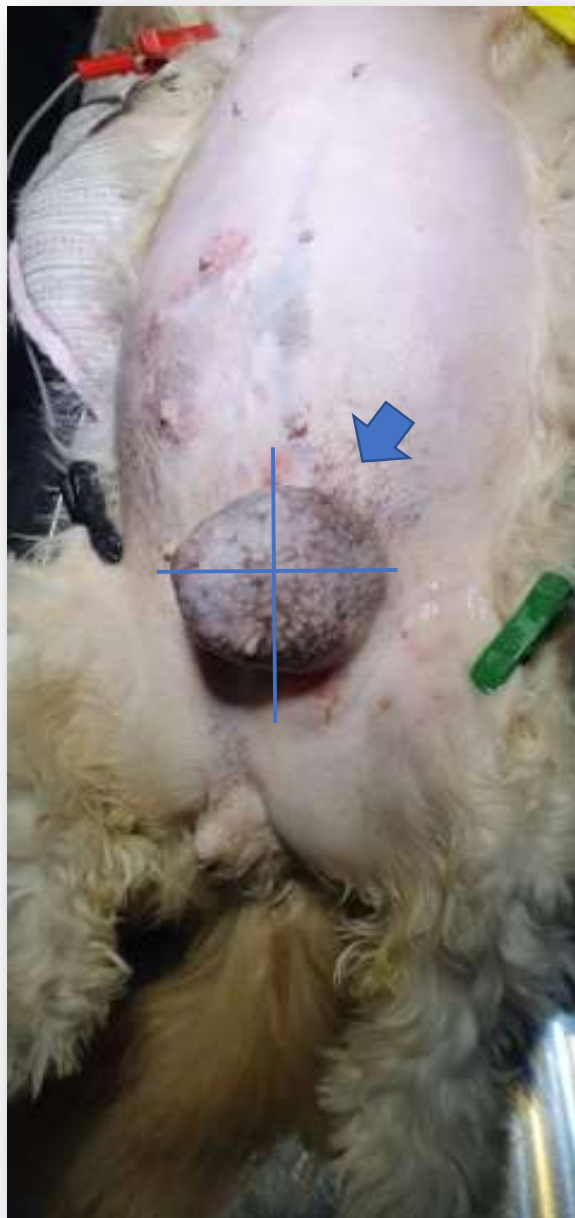


Figura 6. Representação da divisão em quadrantes para aplicação do azul patente em 1 quadrante peritumoral (seta).

Fonte: Elaboração do autor

2.3 Avaliação morfológica

As amostras foram fixadas em solução de formalina tamponada 10% durante 48 horas, e em seguida, foi realizada análise macroscópica das amostras, colhidos fragmentos e as amostras foram passadas para o álcool 70%.

Posteriormente, as amostras foram processadas e incluídas em parafina, e cortadas na espessura de 4 µm em micrótomo, distendidas em lâminas próprias para microscopia, coradas por hematoxilina e eosina, para visualização em microscópio óptico.

A avaliação histopatológica foi usada para confirmação do diagnóstico e definição do subtipo do carcinoma mamário, e também a avaliação do linfonodo para pesquisa de metástase pela coloração de hematoxilina e eosina (H&E). A classificação histopatológica foi realizada de acordo com Golsdhmith (2011). As amostras de linfonodos coradas em H&E foram avaliadas em microscópio óptico por dois observadores independentes, e os seguimentos de linfonodos foram avaliados quanto a presença de macrometástases. Os linfonodos positivos foram excluídos deste estudo, sendo incluídas apenas as amostras de linfonodos negativos.

2.4 Imuno-histoquímica

Para a realização da imuno-histoquímica dos linfonodos foram realizados cortes dos blocos de parafina de 3 µm e distendidos em lâminas próprias para imuno-histoquímica (StarFrost, Knittel, Braunschweig, Alemanha). As lâminas foram transferidas para estufa com temperatura entre 57°C por no máximo 24 horas. E, em seguida, as lâminas foram para a cuba com tampa, sendo passadas pelas soluções de xilol 1, xilol 2, álcool absoluto 1, álcool absoluto 2, álcool absoluto 3, álcool 95% e álcool 85% para a desparafinização.

A recuperação antigênica foi realizada em panela de pressão (Pascal, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA) com solução de citrato pH 6.0 durante 1 hora, e o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado a partir de uma solução peroxidase blocking reagente Dako® (anti-mouse e rabbit), durante 20 minutos. Após esta etapa, procedeu-se com o bloqueio de reação inespecífica com solução de leite em pó a 8% (leite em pó desnatado) durante uma hora, em estufa com temperatura de 27°C. A lavagem das lâminas foi realizada com solução tampão TRIS (pH: 7,4) por três vezes. A incubação do anticorpo primário foi feita com o monoclonal mouse anti-Human Cytokeratin clones AE1/AE3 (Dako cytomation, Carpinteria, CA, USA), na diluição de 1:300.

A identificação do anticorpo foi obtida pelo sistema de polímero (N-histofine®) e o EnVision Flex HRP Magenta Substrate Chromogen System (Dako Omnis)®, e as lâminas foram montadas com cola Dako Faramount Aqueous Mounting Medium®, e após secagem observados em microscópio óptico.

Para o controle positivo considerou-se a marcação da mama com carcinoma mamário, uma vez que a expressão existe nessa neoplasia, e para o controle negativo, substituiu-se o anticorpo primário por solução tampão TRIS (pH: 7,4).

2.5 Análise estatística

Foi realizada análise estatística descritiva, com tabulação dos dados no programa computacional Excel. A apresentação dos dados foi baseada na frequência da amostra pelo número total de amostras.

3. RESULTADOS

Foram analisados 142 blocos de parafina para confirmação de diagnóstico de carcinoma mamário, e seu respectivo linfonodo sentinela através do método de H&E.

Foram incluídas apenas amostras com diagnóstico de carcinoma mamário, que apresentavam material suficiente no bloco de parafina. Ao final, foram relacionados 65/142 casos. As características clínicas dos pacientes estão apresentadas no Quadro 1.

Quadro 1. Características clínicas dos pacientes

REGISTRO	Raça	Peso	Idade
P85/16	Pinscher	4,7 kg	6 anos
P119/16	Labrador	65,7 kg	4 anos
P146/16	SRD	6,5 kg	12 anos
P150/16	SRD	10,4 kg	8 anos
P152/16	SRD	5,3 kg	15 anos
P202/16	Poodle	5,9 kg	7 anos
P204/16	Lhasa Apso	6,8 kg	10 anos
P244/16	SRD	8,8 kg	9 anos

P81/17	SRD	4,9 kg	8 anos
P86/17	Cocker Spaniel	12 kg	8 anos
CH34/17	Poodle	6,5 kg	11 anos
CH87/17	SRD	8,2 kg	10 anos
CH05/18	SRD	17 kg	17 anos
CH65/18	Poodle	6,3 kg	12 anos
CH77/18	SRD	8 kg	14 anos
CH78/18	SRD	7,8 kg	13 anos
CH86/18	SRD	6,6 kg	8 anos
CH103/18	SRD	10,5 kg	10 anos
CH114/18	SRD	19,3 kg	10 anos
CH128/18	Boxer	24,5 kg	6 anos
CH129/18	Poodle	7,1 kg	12 anos
CH147/18	Poodle	3,2 kg	8 anos
CH14/19	Pinscher	7,4 kg	9 anos
CH18/19	York Shire	3,7 kg	9 anos
CH19/19	SRD	23,4 kg	11 anos
CH37/19	SRD	4,8 kg	11 anos
CH43/19	Lhasa Apso	6,1 kg	11 anos
CH65/19	Poodle	9,6 kg	13 anos
CH102/19	SRD	5,6 kg	7 anos
CH117/19	SRD	15,7 kg	9 anos
PAM 3 (Lady)	Poodle	7 kg	16 anos
PAM 4 (Menina)	SRD	9,3 kg	6 anos
PAM 5 (Nina)	SRD	9,5 kg	5 anos
PAM 6 (Ravena)	SRD	25 kg	5 anos
PAM 7 (Lulu)	SRD	16,9 kg	13 anos
PAM 11 (Belinha)	SRD	16,2 kg	8 anos
PAM12 (Tayra)	Cocker Spaniel	11,9 kg	12 anos
PAM 14 (Luna)	Spitz Alemão	4,7 kg	10 anos
PAM 15 (Ravena)	SRD	25 kg	5 anos
PAM 16 (Belinha)	Cocker Spaniel	12 kg	13 anos
PAM 17 (Pit)	SRD	17,2 kg	12 anos
PAM 18 (Lola)	Labrador	36,7 kg	9 anos
PAM 19 (Mel)	Poodle	4,9 kg	13 anos
PAM 21 (Sol)	Boxer	23,5 kg	7 anos
PAM 22 (Lola)	Labrador	32,2 kg	10 anos
PAM 23 (Lily)	SRD	20,5 kg	8 anos
PAM 24 (Nina)	Pinscher	8,4 kg	9 anos
H184/22	SRD	30 kg	11 anos
H178/22	SRD	17,2 kg	6 anos
H391/22	Lhasa Apso	6,9 kg	13 anos
H358/21	Shih tzu	6,2 kg	7 anos
H195/22	SRD	8,8 kg	10 anos
H314/22	Shih tzu	6,9 kg	6 anos
H380/21	Poodle	4,8 kg	10 anos

H321/22	SRD	9 kg	14 anos
H167/22	Labrador	32,5 kg	7 anos
H223/22	SRD	8 kg	10 anos
H418/21	Poodle	3 kg	0,9 anos
H380/21	Poodle	4,8 kg	10 anos
H220/22	SRD	26,9 kg	8 anos
0001/23	Dachshund	11,3 kg	11 anos
0005/23	SRD	12 kg	9 anos
0007/23	SRD	9 kg	15 anos
0008/23	Blue Heller	23 kg	8 anos
H113/23	SRD	14,4 kg	10 anos

*SRD: sem raça definida

Diante das características clínicas, 33 casos foram de SRD (50,76%), 11 poodle (16,92%), 4 labrador (6,15%), 3 cocker spaniel (4,61%), 3 lhasa apso (4,61%), 3 pinscher (4,61%), 2 boxer (3,07%), 2 shih tzu (3,07%), 1 blue heller (1,53%), 1 dachshund (1,53%), 1 spitz alemão (1,53%) e 1 york Shire (1,53%).

Em relação a idade dos pacientes, 5 tinham de 0 a 5 anos (7,69%), 37 tinham de 6 a 10 anos (37%), e 23 tinham acima de 10 anos (23%), sendo 9 meses a menor idade e 17 anos a maior.

Foram diagnosticados 65 casos com carcinoma mamário, negativos para macrometástase em linfonodo sentinela no método hematoxilina e eosina, e desses, 13 foram positivos para micrometástase no método de imuno-histoquímica para pan-citoqueratina AE1/AE3, conforme quadro 2, equivalendo a 20% do total de casos.

Dentre os 13 casos positivos para micrometástase, 5 tiveram diagnóstico de carcinoma em tumor misto grau I (38,46%), 3 carcinoma papilar intraductal grau I (23,07%), 1 carcinoma tubulopapilar grau II (7,69%), 1 carcinoma tubulopapilar grau I (7,69%), 1 carcinoma sólido grau III (7,69%), 1 carcinoma complexo grau II (7,69%) e 1 carcinoma invasivo micropapilar grau I (7,69%).

Quadro 2. Amostras submetidas a hematoxilina e eosina (H&E) e a imuno-histoquímica com pancitoqueratina AE1 e AE3, sendo negativo (N) e positivo (P)

REGISTRO	DIAGNÓSTICO	CITOQUERATINA
P85/16	Carcinoma em tumor misto grau I	P

P119/16	Carcinoma tubulopapilar grau I	N
P146/16	Carcinoma papilar intraductal grau I	P
P150/16	Carcinoma em tumor misto grau I	N
P152/16	Carcinoma tubulopapilar grau II associado a carcinoma misto grau I e carcinoma invasivo micropapilar grau III	P
P202/16	Carcinoma papilar intraductal grau I e carcinoma complexo grau II	P
P204/16	Carcinoma tubulopapilar grau I e carcinoma complexo grau I	P
P244/16	Carcinoma sólido grau III	P
P81/17	Carcinoma complexo grau II	P
P86/17	Carcinoma invasivo micropapilar grau I e carcinoma em tumor misto grau I	P
CH34/17	Carcinoma em tumor misto grau I	P
CH87/17	Carcinoma em tumor misto grau I	P
CH05/18	Carcinoma em tumor misto grau I e carcinoma papilar intraductal grau I	N
CH65/18	Carcinoma papilar intraductal grau I e carcinoma em tumor misto grau I	P
CH77/18	Carcinoma em tumor misto grau I	N
CH78/18	Carcinoma em tumor misto grau I	N
CH86/18	Carcinoma em tumor misto grau I	N
CH103/18	Carcinoma complexo grau II e carcinoma em tumor misto grau I	N
CH114/18	Carcinoma em tumor misto grau I	P
CH128/18	Carcinoma em tumor misto grau I e carcinoma papilar intraductal grau II associado a carcinoma sólido grau II	N
CH129/18	Carcinoma complexo grau I	N
CH147/18	Carcinoma em tumor misto grau I	N

CH14/19	Carcinoma mamário com mioepitelioma maligno grau II	N
CH18/19	Carcinoma tubulopapilar cístico grau I associado a carcinoma complexo grau I	N
CH19/19	Carcinoma tubulopapilar grau I associado com carcinoma complexo grau I	N
CH37/19	Carcinoma tubulopapilar cístico grau I associado a carcinoma complexo grau I	N
CH 43/19	Carcinoma complexo grau I	N
CH65/19	Carcinoma tubulopapilar grau I	N
CH102/19	Carcinoma complexo grau I	N
CH117/19	Carcinoma complexo grau I	N
PAM 3	Carcinoma tubulopapilar grau II	N
PAM 4	Carcinoma complexo grau I	N
PAM 5	Carcinoma tubular grau I	N
PAM 6	Carcinossarcoma	N
PAM 7	Carcinoma sólido grau II	N
PAM 11	Carcinoma em tumor misto grau II	N
PAM 12	Carcinoma sólido grau III	N
PAM 14	Carcinoma tubulopapilar grau II	N
PAM 15	Carcinossarcoma	N
PAM 16	Carcinoma em tumor misto grau I	N
PAM 17	Carcinoma tubular grau I	N
PAM 18	Carcinoma em tumor misto grau I	N
PAM 19	Carcinoma em tumor misto grau I	N
PAM 21	Carcinoma tubular grau I	N
PAM 22	Carcinoma em tumor misto grau I	N
PAM 23	Carcinoma complexo grau I	N

PAM 24	Carcinoma complexo grau I	N
H184/22	Carcinoma complexo grau I	N
H178/22	Carcinoma complexo grau I e carcinoma tubular grau I	N
H391/22	Carcinoma complexo grau I e carcinoma em tumor misto grau I	N
H358/21	Carcinoma complexo grau I	N
H195/22	Carcinoma complexo grau I	N
H314/22	Carcinoma em tumor misto grau I	N
H380/21	Carcinoma em tumor misto grau I	N
H321/22	Carcinoma tubular grau I e carcinoma em tumor misto grau I	N
H167/22	Carcinoma complexo grau I	N
H223/22	Carcinoma tubular grau I	N
H418/21	Carcinoma em tumor misto grau II	N
H380/21	Carcinoma em tumor misto grau I	N
H220/22	Carcinoma sólido grau II	N
0001/23	Carcinoma tubulopapilar grau II	N
0005/23	Carcinoma em tumor misto grau I	P
0007/23	Tumor mamário subtipo sólido grau III	N
0008/23	Carcinoma tubulopapilar grau II	N
H113/23	Carcinossarcoma	N

As amostras negativas para metástase em linfonodo foram submetidas ao exame de imuno-histoquímica, e nas amostras positivas foram observadas um aglomerado de células positivas para pan-citoqueratina AE1/AE3, conforme figura 7 e figura 8.

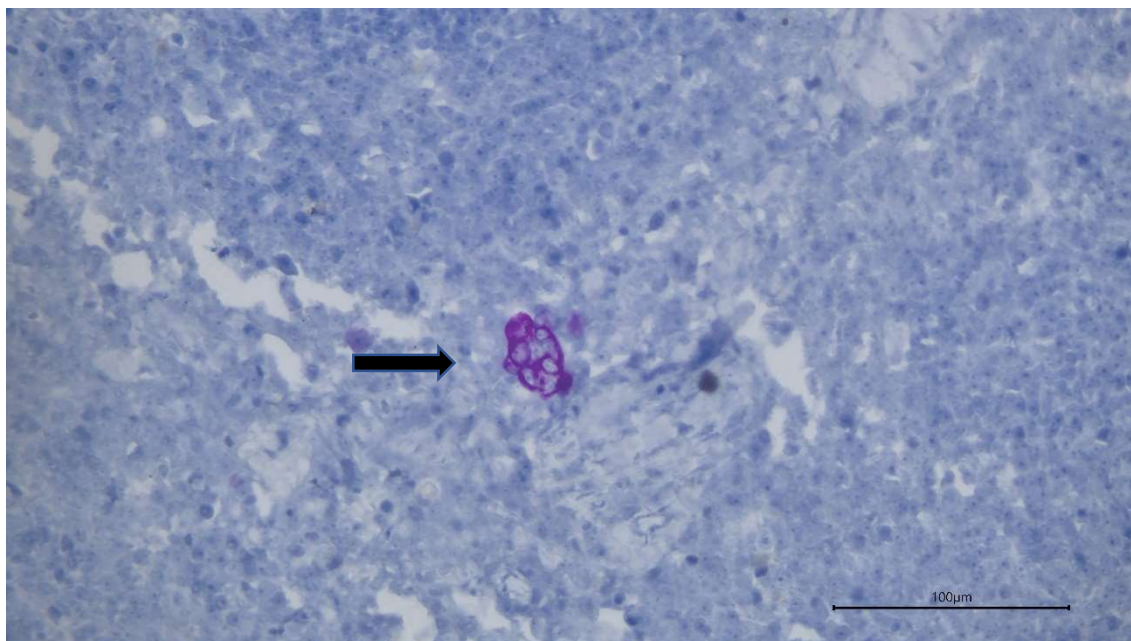


Figura 7. Aglomerado de células positivas para pan-citoqueratina AE1/AE3 (seta).

Fonte: Elaboração do autor.

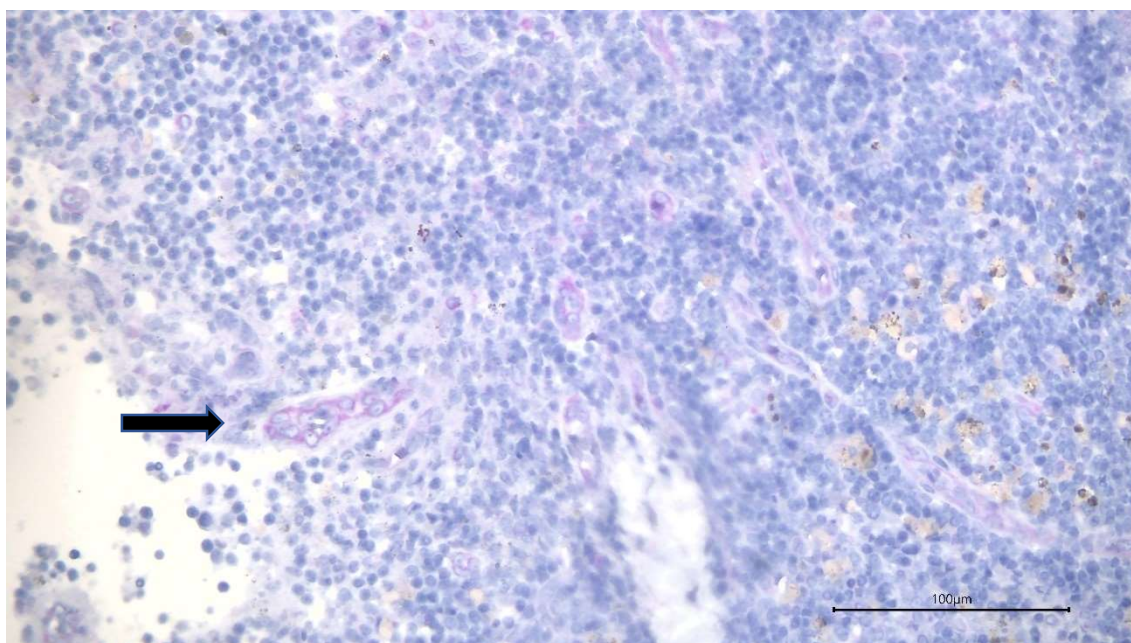


Figura 8. Aglomerado de células positivas para pan-citoqueratina AE1/AE3 (seta).

Fonte: Elaboração do autor.

Nas figuras 7 e 8 a seta indica aglomerado de células epiteliais em linfonodo sentinela pelo método de imuno-histoquímica através do cromógeno magenta, indicando a presença de células tumorais em linfonodo, denominado de micrometástase.

Treze cadelas apresentaram micrometástases detectadas por meio de imuno-histoquímica (20% - 13/65). Foi realizada uma associação entre os fatores clínico-patológicos e a presença de micrometástases em linfonodos sentinelas. Um achado interessante, foi que a maioria das cadelas com micrometástases, apresentaram tumores de grau I (8/13), seguindo por tumores de grau II (3/13) e tumores de grau III (2/13).

4. DISCUSSÃO

As neoplasias mamárias são o subtipo histológico mais incidente em países que não realizam castração dos animais com frequência. Sendo a predisposição racial incerta. Em estudo realizado por Silva (2016) foram descritos 25% dos animais eram SRD, assim como trabalho realizado por Gonçalves (2020) em que foi identificado 22% das pacientes sem raça definida. No presente estudo, foi identificado 50,76% das pacientes SRD. A alta incidência de paciente sem raça definida está provavelmente relacionada à população estudada, bem como outros fatores, como grande parte das amostras serem oriundas de hospitais escolas, e está diretamente envolvido ao poder aquisitivo da população.

Em relação a idade, o tumor de mama normalmente acomete cadelas em torno dos sete anos, conforme esse estudo que identificou 37% das pacientes com idade entre seis e dez anos, e apenas 7,69% tinham até cinco anos. Outro achado interessante, foi que houve uma prevalência de tumores de graduação histológica mais baixa (grau I) em cadelas mais jovens (abaixo de cinco anos), dado esse, confirmado pela literatura (SORENMO, 2009).

Conforme evolução do conhecimento sobre a biologia molecular de tumores caninos, surgiram possibilidades de desenvolvimento de novos

medicamentos, e com isso, os cães passaram a ter possibilidade de tratamento avançado e de alta tecnologia e as pessoas se beneficiam com tratamento com melhores chances de sucesso (GARDNER, 2016; VALDIVIA, 2021). Para essas novas modalidades terapêuticas, o ponto muito importante é selecionar as pacientes que se beneficiariam com os diferentes tratamentos.

Esses avanços não ocorreram apenas do ponto de vista molecular, eles também ocorrem em outras esferas, como por exemplo no tratamento cirúrgico, com destaque para a técnica de linfonodo sentinela.

Na medicina humana, pode ser realizado biopsia trans- operatória em linfonodo sentinela, e pode ser avaliada a necessidade de excisão do linfonodo, com isso, não é realizada linfadenectomia desnecessária (BALASUBRAMANIAN, 2011).

No entanto, o melhor método de exame histológico de linfonodos é altamente debatido nas instituições, pois não é padronizado (ZENG, 2015). O exame de hematoxilina e eosina subestima significativamente a metástases em linfonodo, pois é incapaz de avaliar pequenos aglomerados de células ou mesmo células isoladas do tumor no linfonodo (Dowlatshahi, 2001).

A técnica do linfonodo sentinela é utilizada em tumores sólidos, e auxilia no diagnóstico de metástase em vários tipos de tumores além de câncer de mama (BALASUBRAMANIAN, 2011). Embora, a presença de micrometástase, e de células isoladas nos linfonodos seja controversa, não há como ignorar a importância de adequado estudo, afim de diminuir o falso-negativo em relação a metástase (PIATO, 2008).

Em trabalho realizado por Turner (1997) com 103 pacientes, utilizando coloração de hematoxilina e eosina (H&E) foi identificado 70 pacientes (68%) com linfonodo livre de metástase. Nesses linfonodos foram realizados imuno-histoquímica e 10 linfonodos estavam envolvidos com tumor. Com isso, 10 (14,3%) dos 70 pacientes que estavam livres do tumor por H&E, estavam positivos na imuno-histoquímica (TURNER, 1997).

Em estudo realizado por Piatto (2008), a taxa de micrometástases ocultas no exame de hematoxilina e eosina corresponderam a 9,4% do total de linfonodos sentinelas negativos.

O presente trabalho obteve resultado equivalente com 20 % das amostras positivas na imuno-histoquímica para metástase em linfonodo, e negativas no H&E, confirmando que de 10 a 30% dos linfonodos sentinelas são positivos para micrometástase na imuno-histoquímica, conforme trabalho realizado por Dowlatshashi (2001).

Segundo o mesmo estudo de Dowlatshashi (2001), até 30% dos pacientes humanos com câncer de mama e linfonodos negativos experimentam recorrência da doença dentro de 10 anos, confrontando os exames realizados, e sugerindo um falso negativo pela coloração de H&E.

Em tumores mamários, a imuno-histoquímica não é usada rotineiramente, embora estudos sobre biomarcadores tenham crescido nos últimos 15 anos (Peña, 2014). E indiquem a necessidade de uma avaliação patológica e por imuno-histoquímica após dissecação do linfonodo para que seja feito um prognóstico correto (BALASUBRAMANIAN, 2011).

As células tumorais circulantes podem atuar como bons biomarcadores para potencial metastático tumoral, principalmente em medicina humana, e iniciando na medicina veterinária (KASZAK, 2018).

Os biomarcadores são proteínas que podem ser verificadas no sangue ou tecido, e contém informações sobre a doença, e assim auxilia no tratamento e prognóstico. Em relação ao câncer, expressa proteínas específicas que são os antígenos associados ao tumor. Esses antígenos são chamados de biomarcadores e são encontrados em concentrações diferente do tecido normal (MOBASHERI, 2010).

Assim, os biomarcadores mais estudados em tumores de mama são Ki-67, HER-2 e COX-2, sendo a técnica de imuno-histoquímica mais empregada (KASZAK, 2018; BRANDI, 2023). Os principais desafios enfrentados no desenvolvimento de biomarcadores veterinários são a identificação, validação e qualificação, e assim a padronização (MOBASHERI, 2010; ZAHA, 2014).

Os biomarcadores na medicina humana em carcinoma mamário destacam-se pelo diagnóstico clínico e tratamento correto (ZAHA, 2014; KASZAK, 2018). E são vistos como tratamento individualizado ao paciente e as

necessidades específicas (MOBASHERI, 2010). Porém, há dificuldade em relação a padronização de determinados biomarcadores, e também a validação devido a reprodutibilidade dos resultados (PEÑA, 2014; ZAHA, 2014). Assim, os biomarcadores epiteliais são de grande importante para a invasão tumoral e doença micrometastática de linfonodos (PEÑA, 2014).

Portanto, a imuno-histoquímica com o auxílio da citoqueratina no linfonodo demonstra micrometástase quando apresenta citoqueratina positiva, e revela células não vistas na coloração de hematoxilina e eosina. Diante disso, não se deve afirmar que não há metástase em linfonodo quando negativo apenas no histopatológico através da hematoxilina e eosina (TURNER, 1997).

A melhor abordagem no uso de marcadores de imuno-histoquímica é associar ao exame padrão de hematoxilina-eosina e usar painéis de marcadores. Os resultados podem variar de acordo com a escolha do fixador, do fabricante do anticorpo e do tipo de imunocoloração (ZAHA, 2014).

O valor prognóstico das micrometástase em cães é ainda desconhecido, ressaltando a importância do diagnóstico através da imuno-histoquímica com informações desconhecidas (MATOS, 2006).

Portanto, os biomarcadores podem determinar o tratamento apropriado e o prognóstico do paciente, mas necessitam de estudos específicos (PEÑA, 2014).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O exame de hematoxilina e eosina é considerado um exame padrão para diagnóstico de inúmeras neoplasias, porém conforme foi observado nos resultados obtidos no presente estudo, a imuno-histoquímica pode identificar micrometástase não visualizada no exame padrão de hematoxilina e eosina. Com isso, a imuno-histoquímica para linfonodo sentinela pode trazer resultados mais confiáveis, propiciando prognóstico e tratamento correto ao paciente.

Portanto, a utilização da técnica de imuno-histoquímica foi importante para detecção de micrometástases nos linfonodos sentinelas, e pode

representar uma técnica importante a ser implementada na rotina dos pacientes oncológicos.

6. REFERÊNCIAS

- BALASUBRAMANIAN, S.P., HARRISON, B.J. Systematic review and meta-analysis of sentinel node biopsy in thyroid cancer. **British Journal of Surgery**, v.98, p.334-344, 2011.
- BESERRA, H. E. O., GRANDI, F., DUFLOTH, R. M., PINHEIROS, L. G. P., MIOT, H.A., VEXENAT, S.C.O.R., ROCHA, N.S. Metastasis of mammary carcinoma in bitches: Evaluation of the sentinel lymph node technique. **Advanced in Breast Cancer Research**, v. 5, p. 58-65. 2016.
- BRANDI, A., LAINETTI, P.F., ELIAS, F., RODRIGUES, M.M.P., MORAES, L.F., LAUFER-AMORIM, R., CAMARGO, L.S., GOMES, C.O.M.S., FONSECA-ALVES, C.E. Firocoxib as a potential neoadjuvant treatment in canine patients with triple-negative mammary gland tumors. **Animals**, v.13, n.60, 2023.
- CHOCTEAU, F., ABADIE, J., LOUSSOUARN, D., NGUYEN, F., Proposal for a histological staging system of mammary carcinomas in dogs and cats. Part 1: canine mammary carcinomas. **Front. Vet. Sci.**, v.6, 2019.
- DOWLATSHAHI, K., FAN, M., ANDERSON, J.M., BLOOM, K.J. Occult metastases in sentinel nodes of 200 patients with operable breast cancer. **Ann Surg Oncol**, v.8, n.8, p.675-681, 2001.
- GARTNER, F., GERALDES, M., CASSALI, G., REMA, A., SCHMITT, F. DNA measurement and immunohistochemical characterization of epithelial and mesenchymal cells in canine mixed mammary tumours: putative evidence for a common histogenesis. **The veterinary journal**, v.158, p.39-47, 1999.
- GARDNER, H.L., FENGER, J.M., LONDON, C.A. Dogs as a model for cancer. **Annu Rev Anim Biosci.**, v.4, p.199-222, 2016.
- GOLDSCHMIDT, M., PEÑA, L., RASOTTO, R., ZAPPULLI, V. Classification and grading of canine mammary tumours. **Veterinary Pathology**, v.48, n.1, p. 117-131, 2011.
- GONÇALVES, R.O., SANTOS, A.L.S.L., CHAGAS, J.D.R., CRESPILO, A.M., ROIER, E.C.R., LEITE, S.M.G., MORAES, R.F.F. Neoplasias mamárias em cadelas: um estudo estatístico para auxiliar no tratamento. **Pubvet**, v.14, n.5, p.1-7, 2020.

KASZAK, I., RUSZCZAK, A., KANAF, S., KACPRZAK, K., KRÓL, M., JURKA, P. Current biomarkers of canine mammary tumours. **Acta Vet Scand**, p. 60-66, 2018.

KOCH, C., KUSKE, A., JOOSE, S.U., YIGIT, G., SFLOMOS, G., THALER, S., SMIT, D.J., WERNER, S., BORGMANN, K., GÄRTNER, S., MOHAMMADI, P.M., BATTISTA, L., CAYREFOURCQ, L., ALTMÜLLER, J., RIESTER, G.S., RAITHATA, K., ZIBAT, A., GOY, Y., OTT, L., BARTKOWIAK, K., TAN, T.Z., ZHOU, Q., SPEICHER, M.R., MÜLLER, V., TOBIAS M.D., JÜCKER, M., THIERY, J.P., BRISKEN, C., RIETHDORF, S., PANABIÈRES, C.A., PANTEL, K., Characterization of circulating breast cancer cells with tumorigenic and metastatic capacity, **EMBO Mol Med.**, v.12, n.9, 2020.

LIU, D., XIONG, H., ELLIS, A.E., NORTHRUP, N.C., JR RODRÍGUEZ, C.O., O'REGAN, R.M., DALTON, S., ZHAO, S., Molecular homology and difference between spontaneous canine mammary cancer and human breast cancer. **Cancer Res.**, v.74, n.18, p.5045-5056, 2014.

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 clinico-pathological variables, **J. Comp. Path.**, v.134, p.182-189, 2006.

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

MOBASHERI, A., CASSIDY, J. P., Biomarkers in veterinary medicine: Towards targeted, individualised therapies for companion animals. **The veterinary journal**, v.185, p.1-3, 2010.

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

PIATO, J.R.M., PINCERATO, K.M., GOMES, V.C.S., CARVALHO, F.M., PINHEIRO, W.S., BARACAT, E.C. Metástase oculta em linfonodo sentinela no

câncer de mama em estádios iniciais. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.30, n.9, p.432-436, 2008.

RANGEL, M.C., BERTOLETTE, D., CASTRO, N.P., KLAUZINSKA, M., CUTTITTA, F., SALOMON, D.S. Developmental signaling pathways regulating mammary stem cells and contributing to the etiology of triple-negative breast câncer. **Breast Cancer Res Treat.**, v.156, p.211-226, 2016.

SILVA, D.A.P. Estudo característico dos tumores mamários da cadela – Perspectivas e enquadramento clínico. (Tese mestrado)- Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Lisboa, p.119, 2016.

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

SOULTANI, C., PATSIKAS, M.N., KARAYANNOPOULOU, M., JAKOVLJEVIC, S., CHRYSSOGONIDIS, I., PAPAZPGLOU, L., PAPAIOANNOU, N., PAPADOPOULOU, PAVLIDOU, K., ILIA, G.M., KAITZIS, D.G., ILIA, T.M., Assessment of sentinel lymph node metastasis in canine mammary gland tumours using computed tomographic indirect lymphography, **Vet. Radiol. Ultrasound**, v.0, n.0, p.1-10, 2016.

SPRANG, E.P.M.T., GRACANIN, A., MOL, J.A., Molecular signaling og progesterone, growth hormone, wnt, and HER in mammary glands of dogs, rodents, and humans: new treatmente target identification. **Front Vet Sci.**, v.4. p. 53, 2017.

TURNER, R.R., OLLILA, D.W., KRASNE, D.L., GIULIANO, A.E. Histopathologic validation of the sentinel lymph node hypothesis of breast carcinoma. **Annals of surgery**, v.226, n.3, p.271-278, 1997.

VALDIVIA, G., ALONSO-DIEZ, Á., PÉREZ-ALENZA, D., PEÑA, L. From conventional to precision therapy in canine mammary cancer: A comprehensive review. **Frontiers in veterinary science**, v.8, 2021.

XU, X., ROBERTS, S.A., PASHA, T.L., ZHANG, P.J., Undesirable cytokeratin immunoreactivity of native nonepithelial cells in sentinel lymph nodes from

patients with breast carcinoma. **Arch Pathol Lab Med**, v. 124, p.1310-1313, 2000.

ZAHA, D.C., Significance of immunohistochemistry in breast cancer. **World J Clin Oncol**, v. 5, n.3, p.382-392, 2014.

ZENG, J., ALEXANDER, M.A., NIMEH, D., DARVISHIAN, F. A note of caution: Variable cytokeratin staining in sentinel node metástases. **Internacional Journal of Surgical Pathology**, v.23, n.7, p.549-552, 2015.