

UNIVERSIDADE PAULISTA - UNIP

**Abordagem imuno-histoquímica otimiza a identificação de
micrometástases nodais em cães portadores de carcinomas
mamários**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista - UNIP para
a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Vinicius Soriano Coelho

**SÃO PAULO
2014**

Vinicius Soriano Coelho

Abordagem imuno-histoquímica otimiza a identificação de micrometástases nodais em cães portadores de carcinomas mamários

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista - UNIP para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Orientador: Prof. Dr. José Guilherme Xavier

**SÃO PAULO
2014**

FICHA CATALOGRÁFICA

Coelho, Vinicius Soriano.

Abordagem imuno-histoquímica aprimora a identificação de micrometástases nodais em cães portadores de carcinomas mamários / Vinicius Soriano Coelho - 2013.

48 f.: il. color.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Paulista, São Paulo, 2013.

Vinicius Soriano Coelho

**Abordagem imuno-histoquímica otimiza a identificação de
micrometástases nodais em cães portadores de carcinomas
mamários**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista - UNIP para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Orientador: Prof. Dr. José Guilherme Xavier

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

_____/_____
Prof. Dr. José Guilherme Xavier
Universidade Paulista – UNIP

_____/_____
Profa. Dra. Leoni Villano Bonamin
Universidade Paulista – UNIP

_____/_____
Profa. Dra. Silvia Regina Kleeb
Universidade Metodista - UMESP

**SÃO PAULO
2014**

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	08
1.1. Características gerais do tumor de mama canino	09
1.2. Neoplasia mamária canina como modelo em patologia comparada .	10
1.3. Morfologia mamária	11
1.4. Diagnóstico e classificação histológica	13
1.5. Disseminação neoplásica em carcinomas mamários caninos	14
1.6. Micrometástases	15
1.7. Prognóstico em carcinomas mamários	16
1.8. Uso da imuno-histoquímica em medicina veterinária	19
1.9 Referências	21
2. Artigo	25

Resumo

As neoplasias mamárias estão entre os tumores mais frequentes em cadelas adultas não castradas. Os processos malignos representam mais de 50% dos casos, sendo frequente a metastatização para linfonodos, pulmões, fígado, rins, e menos frequentemente, ossos. Na patologia mamária humana a imuno-histoquímica é empregada rotineiramente com fins diagnósticos, prognósticos e preditivos. O objetivo deste estudo foi comparar a imunomarcação de cortes histológicos com a técnica convencional de coloração tecidual para a detecção de micrometástases nodais em cães com carcinoma mamário. Uma série de 51 linfonodos provenientes de 47 cães com carcinomas foi avaliada por meio de cortes corados com hematoxilina e eosina e imunomarcados com pan-ceratina. Com o procedimento imuno-histoquímico detectaram-se micrometástases em 6,8% dos casos previamente negativos pela hematoxilina-eosina. Este estudo evidenciou a contribuição da avaliação imuno-histoquímica na detecção de metástases em linfonodos de cães.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: cão, imuno-histoquímica; linfonodos; micrometástases; tumor de mama

ABSTRACT

Spontaneous mammary tumors are the most common neoplasms in the intact adult female dog. The malignant tumors account for up to 50% of cases, that frequently metastasizes to regional lymph nodes, lungs, liver, kidneys and, less frequently, bones. In human breast pathology immunohistochemistry is routinely used with diagnostic, prognostic and predictive purposes. The aim of this study was to compared immunolabelling of histological specimens with conventional staining in the detection of nodal micrometastases from dogs with mammary carcinoma. A series of 51 lymph nodes from 47 dogs with carcinomas were evaluated by staining with haematoxylin and eosin and immunohistochemically for antibodies to pan-keratin. The immunohistochemical test detected occult micrometastases in 6,8% of the lymph nodes previously negative by haematoxylin and eosin staining. This study indicated the value of immunohistochemical labelling for the detection of epithelial metastases in canine lymph node samples.

INDEX TERMS: dog, immunohistochemistry; lymph nodes; mammary tumor; micrometastases

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A longevidade de animais de companhia aumentou nos últimos anos, graças ao aprimoramento das técnicas de manejo e ao desenvolvimento da biotecnologia, otimizando o diagnóstico, prevenção e terapêutica aplicados a esses animais. Em consequência, doenças associadas ao envelhecimento, como o câncer, passaram a integrar a lista das principais morbidades nesses pacientes (Matos et al. 2012), sendo a principal causa de óbito em animais de companhia (Dorn 1976, Gobar et al. 1998). O aumento da incidência das condições oncológicas em animais de companhia representou um impulso para a pesquisa na área, buscando-se amplificar a acurácia diagnóstica, prognóstica e terapêutica (Ruiz 2005). Dentre as diversas condições oncológicas, o estudo acerca das neoplasias mamárias desperta grande interesse, principalmente pela elevada incidência de tumores malignos em cadelas, que ocorre em grande medida como reflexo do diagnóstico tardio, o que compromete o tratamento e reduz a taxa de sobrevida dos animais (Toríbio et al. 2012), contribuindo para a mortalidade associada à condição a partir do desenvolvimento de metástases (Klopfleisch et al. 2010).

1.1 Características gerais dos tumores mamários caninos

Os tumores mamários são neoplasias comuns em diversas espécies, incluindo cães, gatos, ratos, camundongos e humanos, sendo raros em outras espécies domésticas (Hampe e Misdorp 1974). Em cães, estão entre os problemas clínicos mais frequentes (Bostock 1977, Brodey et al. 1983, Madewell & Theilen 1987, Sorenmo 2003, Karayannopoulou et al. 2005, Filho et al. 2010, Klopfleisch et al. 2010, Sorenmo et al. 2011, Hermo et. al 2011, Rivera e Eulers 2011, Feliciano et al. 2012, Peña et. al 2013, Santos et. al 2013), e compõem aproximadamente 52% de todas as neoplasias que afetam as fêmeas dessa espécie (Filho et al. 2010, Feliciano et al. 2012).

A neoplasia mamária acomete principalmente cadelas não castradas ou castradas

tardiamente, de meia-idade, de 8 a 11 anos. Vários fatores adicionais, incluindo definição racial, dieta e obesidade, são associados ao maior risco de desenvolvimento do tumor mamário (Sautet et al. 1992, Sorenmo 2003, Karayannopoulou et al. 2005, Sorenmo et al. 2011).

A etiologia do câncer de mama é multifatorial, envolvendo a participação de componentes genéticos, hormonais, nutricionais e ambientais (Toríbio et al. 2012), e depende de anormalidades genéticas e da inter-relação entre as células tumorais, estromais e inflamatórias (Lima et al. 2010).

Uma predisposição genética pode ser antecipada, em mulheres e em cães, sendo a prevalência do tumor maior em algumas raças, porém, são poucos os estudos relacionados com o mapeamento genético do tumor mamário canino (Rivera e Eulers 2011).

Em cães e gatos, a progesterona estimula a síntese de hormônio do crescimento na glândula mamária, com proliferação lóbulo-alveolar e consequente hiperplasia de elementos mioepiteliais e secretórios, induzindo a formação de nódulos benignos em animais jovens (Toríbio et al. 2012).

1.2 Neoplasia mamária canina como modelo em patologia comparada

As neoplasias mamárias em cadelas e o câncer de mama em mulheres apresentam similaridades epidemiológicas, clínicas, biológicas e genéticas (Madewell e Theilen 1987, Mottolese et al. 1994, Lima et al. 2010, Klopfleisch et al. 2010, Toríbio et al. 2012). Assim, assemelham-se a faixa etária de aparecimento, morfologia, efeito protetor pela ovário-hysterectomy, presença de receptores de estrógeno e progesterona, órgãos-alvo de metástase, evolução clínica e, em alguns casos, hereditariedade (Feliciano et al. 2012). Ainda, apresentam similaridades histológicas e imuno-histoquímicas (Madewell e Theilen 1987, Mottolese et al. 1994).

Em função desses fatores, há algum tempo são estudadas como modelo biológico para o câncer de mama em mulheres (Madewell e Theilen 1987, Mottolese et al. 1994, Lima et al. 2010, Rivera, Eulers 2011, Feliciano et al. 2012).

O câncer de mama em mulheres é considerado de extrema importância para a saúde pública, motivando estudos sobre prevenção e diagnóstico precoce, buscando reduzir a morbidade e mortalidade relacionadas com essa neoplasia (Toríbio et al. 2012).

Na espécie humana os principais fatores de riscos considerados são a idade da menstruação, idade do primeiro parto, tratamento hormonal após a menopausa, obesidade, consumo de álcool e familiares de primeiro grau com a doença (Rivera e Heulen 2011).

1.3 Morfologia mamária

A glândula mamária dos mamíferos é uma glândula sudorípara apócrina modificada, encontrada apenas nessa classe (Sorenmo et al. 2011), e sofre contínuas modificações durante a vida, particularmente devido ao crescimento corpóreo e à estimulação hormonal, de modo que os últimos estágios de desenvolvimento na fêmea adulta ocorrem somente durante a gravidez, existindo amplo espectro de “normalidade” cito e histológica mamária (Russo et al. 1990). A cada gravidez, há proliferação do tecido ductal, diferenciação para ácinos produtores de leite, secreção de leite pelas células acinares, e, no fim da lactação, involução do componente secretor da glândula, com preservação das estruturas ductais (Sorenmo et al. 2011).

As cadelas possuem em geral cinco pares de glândulas mamárias dispostas longitudinalmente, designadas no sentido craniocaudal: torácicas craneais, torácicas caudais, abdominais craneais, abdominais caudais e inguinais (Peleteiro, 1994; Zuccari et al. 2001).

A mama consiste de uma rede de ductos cercados por um estroma fibrovascular e rico em adipócitos, de díctulos, ductos terminais intralobulares e ductos terminais extralobulares, que drenam para o ducto interlobular, formando a chamada unidade ductal

tubular terminal (TDLU). O estroma mamário na espécie humana corresponde a mais de 80% do volume mamário, sendo composto principalmente por tecido adiposo, tecido conjuntivo denso interlobular, tecido conjuntivo frouxo intralobular e vasos sanguíneos (Ronnov-Jessen et al. 1996).

A circulação linfática ocorre paralelamente às duas cadeias mamárias, inexistindo comunicação entre elas, destacando-se como principais linfonodos regionais os inguinais e os axilares (Peleteiro 1994). O fluido linfático é recebido através dos canais linfáticos aferentes, atravessa a cápsula pelo córtex, atingindo a paracôrte e então a medula, saindo do linfonodo através do canal eferente via hilo (Tsiapali 2011).

Os linfonodos inguinais superficiais drenam as mamas inguinais, abdominais caudais e 30% das abdominais craniais. Os linfonodos axilares drenam 70% das mamas abdominais craniais, além das torácicas craniais e caudais. A glândula abdominal cranial possui, portanto, drenagem mista (Patsikas & Dessiris 1996). A maioria das metástases linfonodais é localizada no polo aferente (Tsiapali 2011).

Em cães, os linfonodos ligados anatomicamente às glândulas mamárias estão localizados em duas regiões distintas, axilar e inguinal, em contraste com a mulher, na qual a drenagem conflui para a região axilar (Matos et al. 2006). Ainda, os vasos linfáticos do interstício mamário drenam para os gânglios linfáticos ipsilaterais, e não existe drenagem para linfonodo contralateral; porém, o padrão de drenagem pode ser alterado em caso de neoplasias mamárias (Sorenmo et al., 2011).

A falta de conhecimento em relação ao número total de linfonodos intramamários que podem estar presentes na cadeia mamária e o quanto a presença de um tumor afetaria em sua localização ou drenagem ainda são um obstáculo para a adaptação dos critérios usados na Medicina Humana para a Medicina Veterinária (Matos et al. 2006).

1.4 Diagnóstico, classificação e graduação histológicas

Ao exame físico da cadeia mamária, devem ser registrados os seguintes aspectos das lesões: número, localização, consistência, tamanho e eventuais sinais de aderência aos tecidos adjacentes, deformações das mamas e ulceração na pele (Feliciano et al. 2012). Um exame cuidadoso de glândulas mamárias aparentemente normais de cadelas velhas pode revelar uma série de pequenas lesões, entre elas processos neoplásicos em estágios iniciais de desenvolvimento (Cameron e Faulkin, 1971).

Histologicamente, os tumores são classificados como benignos ou malignos, porém, um grande desafio nas neoplasias mamárias caninas é identificar aquelas realmente malignas (Feliciano et al. 2012). Os critérios mais importantes para o diagnóstico de tumores mamários malignos em cães com base em cortes corados pela hematoxilina-eosina são padrão arquitetural, pleomorfismo celular e nuclear, índice mitótico, presença de áreas de necrose distribuídos aleatoriamente dentro da neoplasia, invasão linfática e peritumoral, e metástases em linfonodos regionais (Goldschmidt et al., 2011).

A incidência dos tumores mamários, de caráter benigno e maligno, e os subtipos neoplásicos, apresentam elevada heterogeneidade em consequência da utilização de diferentes métodos de classificação histopatológica e da ausência de critérios homogêneos na diferenciação dos tipos tumorais (Teixeira et al. 2011, Toríbio et al., 2012). Ademais, tipos histológicos múltiplos podem ocorrer simultaneamente em uma ou mais glândulas mamárias (Filho et al. 2010).

Em 1974, a Organização Mundial de Saúde publicou a primeira 'Classificação Internacional Histológica de Tumores dos Animais Domésticos, que incluiu tumores e displasias da glândula mamária. Atualmente, a classificação mais empregada é a preconizada pela Organização Mundial de Saúde (Misdorp et al., 1999), porém novos sistemas classificatórios são propostos (Cassali et al. 2011; Goldschmidt et al. 2011).

Embora a literatura apresente alguns sistemas de graduação interessantes, o mais recente e bem fundamentado é o sugerido por Karayannoupoulou et al., 2005, baseado no

método descrito por Elston & Ellis, 1991, para neoplasias mamárias humanas.

Segundo Feliciano et al. 2012, cerca de 50% dos tumores mamários apresentam características de malignidade. Dentre os tumores mamários malignos, os carcinomas são os mais frequentes (Filho et al. 2010, Toríbio et al. 2012), e compreendem entre 28% a 91% do total de casos de neoplasias mamárias caninas (Karayannopoulou et al. 1980, Gilbertson et al. 1983, Zaninovic & Simcic 1991, Sorenmo 2003). Porém, a presença de algumas células com núcleos aumentados e nucléolos proeminentes muitas vezes leva ao excesso de diagnósticos de carcinoma mamário (Goldschmidt et al., 2011).

1.5 Disseminação neoplásica em carcinomas mamários caninos

A disseminação dos tumores mamários costuma ocorrer por invasão local, crescimento intraductal mamário e pelo sistema linfático, para posteriormente atingir a corrente sanguínea produzindo metástases a distância (Stavros 2006, Filho et al. 2010). Os linfonodos sentinelas são

considerados os primeiros a receber drenagem linfática do tumor, e por isso são mais predispostos às metástases (Freitas et al. 2013).

A maioria das neoplasias malignas epiteliais, carcinomas, metastatiza via linfática, enquanto neoplasias mesenquimais malignas, sarcomas, metastatizam via hematógena (Sorenmo et al., 2011).

Assim, as metástases mamárias são mais frequentemente observadas em linfonodos regionais e parênquima pulmonar, sendo eventuais em outros territórios, como coração, baço, adrenais e encéfalo, porém, a maior prevalência ocorre nos linfonodos (Karayannopoulou et al. 1980, Gilbertson et al. 1983, Zaninovic & Simcic 1991, Sorenmo 2003, Filho et al. 2010, Klopfleisch et al. 2010). A maioria das metástases nodais está localizada no polo aferente (Tsiapali 2011).

1.6 Micrometástases

Desde os anos 40 se relata a presença de depósitos tumorais de pequenas dimensões em linfonodos axilares inicialmente avaliados como negativos para células tumorais no exame histológico de rotina, mas seu valor prognóstico permanece incerto (Boer et al., 2010, Amezaga et al. 2010). Contemporaneamente, tais lesões são denominadas micrometástases, e definidas como colônias metastáticas com dimensões entre 0,2 e 2,0 mm de diâmetro, compreendidas como focos de disseminação e colonização neoplásica a distância, caracterizando o linfonodo como positivo para crescimento tumoral (Amezaga et al. 2010, Boer et al., 2010, Carvalho et al. 2010, Tsipali 2011). Discretos agregados neoplásicos, que com menos de 0,2 mm de diâmetro, são definidos como agregados de células tumorais isoladas e não são compreendidos como focos metastáticos, sendo, nessas condições, o linfonodo caracterizado como livre de crescimento neoplásico.

Para a avaliação microscópica de metástases nodais, o linfonodo é definido como tecido linfoide de qualquer dimensão, com arquitetura nodal interna distinta, incluindo folículos linfoideos, com ou sem centros germinativos e seios linfoideos, e envolvidos por uma cápsula fibrosa (Khalifa e Smith 2009).

As dimensões das micrometástases muitas vezes as tornam indetectáveis em cortes corados pela hematoxilina-eosina, particularmente pela elevada densidade celular do parênquima linfoide (Miyake et al. 2001). Assim, para a detecção de micrometástases, técnicas diagnósticas mais sensíveis que a coloração por HE podem ser úteis, como a imuno-histoquímica e a reação em cadeia de polimerase (PCR) (Miyake 2001, Hansen et al. 2009, Amezaga et al. 2010). A análise imuno-histoquímica aumenta a sensibilidade do método e promove um melhor estadiamento do paciente, apresentando boa relação custo-benefício (Höinghaus et al. 2007, Freitas et al. 2013). Dentre os marcadores imuno-histoquímicos empregados para a pesquisa de células epiteliais destaca-se um coquetel de ceratinas de diferentes pesos moleculares, útil na cobertura de amplo espectro de

expressão epitelial, o anticorpo anti-AE1/AE3.

O incremento no potencial de detecção de micrometástases ocultas é variável segundo a amostragem, sendo de 9% a 42% de acordo com Boer et al. 2010, de 19% a 32% segundo Amezaga et al. 2010, e de 4% a 50% de acordo com Freitas et al. 2013. Linfonodos com micrometástases ou células isoladas são observados em 23% dos pacientes com câncer de mama (Gobardhan et al. 2011). Matos et al., 2006, realizaram estudo semelhante em cadelas portadoras de carcinomas mamários, evidenciando a presença de células neoplásicas em 9,2% de linfonodos previamente diagnosticados como livres de células tumorais pela histopatologia convencional.

Enquanto a classificação TNM humana considera a quantidade e dimensões do comprometimento de linfonodos regionais para discriminar a amplitude da disseminação nodal na classificação (N), a adaptação do sistema TNM para cães assume qualquer colonização tumoral em linfonodo como N1 (presença de metástases citológicas ou histológicas), não importando as características dessa colonização. A simplificação desse sistema de classificação é óbvia e dificulta os estudos quanto à relevância clínica de micrometástases em cadelas (Matos et al. 2006). Ainda existem controvérsias quanto à classificação TNM em algumas categorias de nódulos, como em casos de células isoladas e depósitos celulares menores que 0,2mm, de repercussões ainda incertas, atualmente considerados livres de colônias neoplásicas, N0 (Matos et al. 2006).

1.7 Prognóstico em carcinomas mamários

O prognóstico em carcinomas mamários em cães depende das dimensões do tumor, classificação histológica, padrão de crescimento e estadiamento clínico (Hellmén et al. 1993, Macewen & Withrow 2001, Teixeira et al., 2011), de modo que o grau de comprometimento dos linfonodos regionais é fator prognóstico determinante para os pacientes que apresentam a forma maligna da doença (Owen 1980, Hellmén et al. 1993, Sorenmo 2003,

Karayannopoulou et al. 2005, Hansen et al. 2009, Filho et al. 2010, Klopfleisch et al. 2010).

A avaliação do linfonodo é uma das primeiras realizadas no paciente com carcinoma mamário (Pinheiro et al. 2009). Sua associação com as dimensões do tumor e a presença de metástase a distância compõem informações necessárias para o adequado estadiamento clínico da doença, integrando o sistema TNM (Viale et al. 1999, Csemi 2000, Wong et al. 2001, Sobin et al. 2009). Clinicamente recomenda-se o estadiamento do processo, sendo o sistema de eleição o sugerido pela Organização Mundial de Saúde – TNM, fornecendo informações prognósticas sobre a neoplasia. Nesse sistema, o T descreve o tumor primário, particularmente em relação ao seu tamanho, sendo: T0: sem evidência de tumor, T1: < 3 cm de diâmetro, T2: entre 3 e 5 cm de diâmetro, T3: > 5cm de diâmetro, T4: carcinoma inflamatório.

O N refere-se ao envolvimento de linfonodos regionais sendo: N0: ausência de envolvimento de linfonodo, N1: linfonodo ipsilateral positivo, N2: envolvimento bilateral de linfonodos.

O M significa metástase sendo: M0: ausência de metástase, M1: presença de metástase.

É possível a associação do estadiamento clínico com a graduação histológica, enriquecendo as informações sobre a biologia tumoral e simultaneamente sobre a provável evolução do processo.

Em estudo de Lima et al., 2010, vários parâmetros foram relacionados com as taxas de sobrevida, incluindo o tipo histológico, a presença de metástase em linfonodos ou pulmões, a distribuição inflamatória e o infiltrado linfocítico. O diagnóstico pré-operatório que inclui o tipo de tumor e as informações prognósticas aumentam as possibilidades de tratamento mais adequado (Hellmén et al. 1993).

A condição do linfonodo sentinel é de grande importância prognóstica e terapêutica em humanos e caninos (Höinghaus et al. 2007). Metástases nodais são tradicionalmente identificadas com a coloração hematoxilina-eosina na rotina (Hansen et al. 2009).

Atualmente, preconiza-se exame detalhado do linfonodo sentinel em lugar do exame de grande número de linfonodos com poucos cortes, tornando a detecção de metástases mais precisa (Freitas et al. 2013), de modo a aumentar a detecção de metástases em linfonodos de 7% até 33% (Wong et al. 2001). Isso porque os métodos de análise dos linfonodos sentinelas tornaram-se mais apurados, com o objetivo de aumentar a acurácia e reduzir os índices de falsos-negativos (Hansen et al. 2009, Carvalho et al. 2010).

Na Medicina Humana, o comprometimento dos linfonodos axilares é o mais importante fator prognóstico no câncer de mama (Wong et al. 2001, Pinheiro et al. 2009, Carvalho et al. 2010 Tsiapali et al. 2011). Segundo Boer et al., 2010, o valor prognóstico diminui à medida que o número de nódulos positivos aumenta.

Muitos estudos investigam o significado clínico das micrometástases nodais identificadas por meio da imuno-histoquímica, havendo controvérsias quanto ao seu significado prognóstico (Hansen et al. 2009). Segundo Gobardhan et al., 2011, o envolvimento de linfonodos com micrometástases afeta o tempo livre de doença e a taxa de sobrevida do paciente. Porém, ainda é necessário pesquisar sobre a taxa de recorrência (Carvalho et al. 2010). No mais, o benefício clínico da detecção de micrometástases relaciona-se à prevenção de recorrências tumorais e à seleção de pacientes para terapias complementares (Doki et al. 2002).

Frente aos procedimentos de nodulectomia e de mastectomia parcial, em geral o patologista veterinário não tem acesso aos linfonodos regionais, avaliando apenas linfonodos locais ou intramamários (Matos et al. 2006).

Em Medicina Humana, o tratamento do câncer de mama é em grande parte baseado em alguns parâmetros clínicos e patológicos, incluindo a avaliação imuno-histoquímica de receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR), receptor de fator de crescimento (HER2), tanto individualmente como em painel de marcadores para aproximar a classificação da subtipagem molecular (Aguiar et al., 2013). Recentemente abordagens nesse sentido são aplicadas a formações mamárias caninas (Dutra et al. 2004, Thuróczy et

al. 2007). No entanto, persiste a busca por novos parâmetros que auxiliem a decisão terapêutica (Teixeira et al., 2011).

1.8 Uso da imuno-histoquímica em medicina veterinária

As novas abordagens diagnósticas em tecidos iniciaram-se na década de 1940, com o desenvolvimento por Coons da técnica de imunofluorescência para a detecção de抗ígenos em cortes por congelação (Coons et al., 1941). Esse foi o marco inicial do que hoje se conhece como imuno-histoquímica, ou seja, a demonstração de抗ígenos específicos em cortes teciduais ou em amostras citológicas, com o uso de reações抗ígeno/anticorpo, que culminam com a deposição de um cromógeno no sítio de ligação (Taylor et al., 2002). O método inicialmente descrito apresentava características técnicas que o inviabilizavam como exame de rotina, o que restringiu por décadas a sua utilização. O desenvolvimento de sistemas de amplificação de sinal com marcação enzimática da reação, de métodos de recuperação antigênica em materiais parafinados, e da tecnologia do hibridoma para a produção de anticorpos possibilitou a incorporação da imuno-histoquímica no Laboratório de Patologia Cirúrgica a partir da década de 1980 (Leong, 1992; Taylor, 1994), justificando o emprego do termo “revolução marrom” relativo à cor do precipitado mais utilizado na revelação da interação抗ígeno-anticorpo no tecido. Uma das grandes vantagens associadas ao método é a colocalização do抗ígeno e da lesão, contribuindo para a compreensão da lesão e da patogenia dos processos (Ramos-Vara & Miller, 2014).

O uso da técnica de imuno-histoquímica em Patologia Veterinária é crescente, pois numerosos anticorpos apresentam reatividade cruzada entre抗ígenos humanos e animais (Teixeira et al., 2011).

Embora inicialmente as duas maiores áreas de aplicação da imuno-histoquímica tenham sido a infectologia e a oncologia, rapidamente a primeira passou a envolver em níveis

crescentes procedimentos de biologia molecular, caracterizados por elevada sensibilidade e especificidades, além de custos inferiores. Em contraposição, o emprego da imuno-histoquímica em oncologia avançou, ampliando as perspectivas originais, relacionadas à identificação histogênica de neoplasias, alcançando abordagens a princípio mais complexas, como informações prognósticas e preditivas (Xavier, 2005).

Atualmente, as principais aplicações da imuno-histoquímica na área oncológica relacionam-se à caracterização histogênica em neoplasias pouco diferenciadas, subtipagem tumoral, pesquisa de sítio primário em carcinomas metastáticos, distinção entre processos benignos e malignos, diferenciação entre condições inflamatórias e neoplásicas, avaliação prognóstica e preditiva de neoplasias e à identificação de micrometástases (Xavier, 2005)

Nesse último aspecto, a imunomarcação com ceratinas se mostra uma valiosa ferramenta para detecção de micrometástases de carcinomas em linfonodos regionais (Peña et al., 2013). As ceratinas compreendem um grupo de filamentos intermediários integrantes do citoesqueleto (Aguiar et al. 2013), expressos principalmente por células epiteliais em diferentes localizações do organismo, sendo reconhecidos ao menos 20 polipeptídeos distintos, particularizados por diferenças no peso molecular e no ponto isoelétrico, sendo numerados consecutivamente de 1 a 20 (Moll et al. 1982).

A imuno-histoquímica com anticorpo anticeratina AE1/AE3 é o método mais comum para detecção de micrometástases em linfonodos de diversos tipos de câncer na Medicina Humana (Doki et al. 2002). Em estudo de Höinghaus et al., 2007, a imuno-histoquímica com AE1/AE3 foi significativamente mais sensível que o exame citológico para detecção de metástases em cães com tumor epitelial maligno.

1.9 Referências

- Aguiar, F.N., Mendes, H.N., Cirqueira, C.S. et al. 2013. Basal cytokeratin as a potential marker of low risk of invasion in ductal carcinoma in situ. *Clinics*. 68: 638-643.
- Amezaga R. U., Ortego J., Fuentes J. et al. 2010. Prognostic value of lymph node micrometastases inpatients with colorectal cancer in Dukes stages A and B (T1-T4, N0, M0). *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 102: 176-186.
- Boer, M., Dijck, A.A.M., Bult, P. et al. 2010. Breast cancer: prognosis and occult lymph Node metastases, isolated tumor cells, and micrometastases. *Journal of the National Cancer Institute*. 102: 410-425.
- Bostock De.. 1977. Neoplasia of the skin and mammary glands in dogs and cats. In: Kirk, R.W. (Ed.), *Current Veterinary Therapy VI*, WB Saunders Co, Philadelphia. 493p.
- Brodey R.S., Goldshmidt, M.H. & Roszel, J.R. 1983. Canine mammary gland neoplasms. *Journal of The American Animal Hospital Association*. 19: 61-90.
- Cameron A.M. & Faulkin L.J. 1971. Hyperplastic and inflammatory nodules in the canine mammary gland. *Journal of the National Cancer Institute*. 47: 1277-87.
- Carvalho S. M. T., Netto, M. M., Pimentel L. A. M. et al. 2010. Sentinel node biopsy in breast cancer: results in a large series. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 43: 593-599.
- Cassali G.D., Lavalle G.E., De Nardi A.B. et al. 2011. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*. 4: 153-180.
- Coons A.H., Creech H.J., Jones R.N. 1941. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proceedings of the Society of Experimental Biological Medicine*. 47: 200-207.
- Dorn C.R. 1976. Epidemiology of canine and feline tumors. *Compendium on Continuing Education for Practising Veterinary*. 12: 307-312.
- Dutra A.P., Granja N.V.M., Schmitt F.C. et al. 2004. c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 37: 1673-1681.
- Elston C.W. & Ellis I.O. 1991. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 19: 403-10.
- Filho J.C.O., Kommers G.D., Masuda E.K. et al. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. 2010. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 30: 177-185.
- Feliciano M. A. R., Silva A. S., Peixoto R. V. R., Galera P. D., Vicente W. R. R. 2012. Estudo clínico, histopatológico e imunoistoquímico de neoplasias mamárias em cadelas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 64(5): 1094-1100.
- Freitas A. H. A., Wainstein A. J. A., Nunes T. A. 2013. Ex vivo sentinel lymph node

- investigation in colorectal cancer. *Journal of Coloproctology*. 33(1): 16-21.
- Gilbertson S.R., Kurzman I.D. & Zacharau R.E. 1983. Canine mammary neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Veterinary Pathology*. 20: 127-42.
- Gobardhan P. D., Elias S. G., Madsen E. V. E., Wely B. V., Wildenberg F. V. D., Theunissen E. B. M., Ernst M. F., Wijsman J. H., Bongers V., Gorp J. V., Dalen T.V. 2011. *Surgical Oncology*. 18: 1657-1664.
- Gobar G.M., Case J.T., Kass P.H. Program for surveillance of causes of death of dogs, using the Internet to survey small animals veterinarians. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 213: 251-256, 1998.
- Goldschmidt, M., Peña, L., Rasotto, R., Zappulli, V. 2011. Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*. 48: 117-131.
- Hampe J.F. & Misdorp W. 1974. Tumours and dysplasia of the mammary gland. *Bulletin of the World Health Organization*. 50: 111-33.
- Hansen N. M., Grube B., Tuner R. R., Brenner R. J., Sim M. S., Giuliano A. E. 2009. Impact of micrometastases in the sentinel node of patients with invasive breast cancer. *Journal of clinical oncology*. 28: 4679-4684.
- Hellmén E., Bergström R., Holmberg L., Spångberg I.B., Hansson K. & Lindgren A. 1993. Prognostic factors in canine mammary tumours: A multivariate study of 202 consecutive cases. *Vet. Pathol.* 30:20-27.
- Herimo, G. A., Turic, E., Angelico, D., Scursoni, A.M., Gomez, D.E., Gobello, C., Alonso, D.F. 2011. Effect of adjuvant perioperative desmopressin in locally advanced canine mammary carcinoma and its relation to histologic grade. *Journal of american animal hospital association*. 47(1): 21-27.
- Hoinghaus R., Von Wasielewski R., Heiwicker-Trauewein M., Freund M. & Mischke R. 2007. Immunocytological detection of lymph node metastases in dogs with malignant epithelial tumours. *Journal of Comparative pathology*. 137: 1-8.
- Khalifa M. A., Smith A. Lymph node assessment: Issue in pathology. 2009. *Journal of surgical oncology*. 99: 260-264.
- Karayannopoulou M., Kaldrimidou E. & Dessiris A. 1980. Some epidemiological aspects of canine mammary tumours treatment and prognosis, *Bulletin of the Hellenic Veterinary Society*. 40: 111-21.
- Karayannopoulou M., Kaldrimidou E., Constantinidis T.C. & Dessiris A. 2005. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: Application of a human grading method. *J. Comp. Pathol.* 133:246-252
- Klopfleisch R., Lenze D., Hummel M., Gruber A. D. 2010. Metastatic canine mammary carcinomas can be identified by a gene expression profile that partly overlaps with human breast cancer profiles. *BMC Cancer*. 10: 618-629.
- Leong A.S., Wannakrairot P. 1992. A retrospective analysis of immunohistochemical staining in identification of poorly differentiated round cell and spindle cell tumors – results, reagents and costs. *Pathology*. 24: 254-260.

- Lima A. E., Araújo M. S. S., Neto J. M. C., Carvalho A. T., Melo S. M. B., Cardoso S. V., Filho O. A. M., Serakides R., Cassali G. D. 2010. Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. *BMC Cancer.* 10: 1-14.
- Macewen E.G. & Withrow S.J. 2001. Tumors of the mammary gland. p. 356. In: Macewen E.G. & Withrow S.J. (3Ed.), *Small Animal Clinical Oncology.* Saunders, Philadelphia. 768p.
- Madewell B.R & Theilen G.H. 1987. Tumors of the mammary gland. p. 327-44. In: Madewell B.R & Theilen G.H. (2Ed.), *Veterinary Cancer Medicine.* Lea & Febiger, Philadelphia. 676p.
- Matos A.J.F., Faustino A.M.R., Lopes C., Rutteman G.R. & Gartner F. 2006. Detection of lymph node micrometastases in malignant mammary tumours in dogs by cytokeratin immunostaining. *Veterinary Record.* 158: 626-630.
- Matos, A.J.F., Baptista, C.S., Gärtner, M.F., Rutteman, G.R. 2012. Prognostic studies of canine and feline mammary tumours: The need for standardized procedures. *The Veterinary Journal.* 193: 24-31.
- Miyake Y., Yamamoto H., Fujiwara Y., Ohue M., Sugita Y., Tomita N., Sekimoto M., Matsuura N., Shiozaki H., Monden M. 2001. Extensive micrometastases to lymph nodes as a marker for rapid recurrence of colorectal cancer: a study of lymphatic mapping. *Clinical Cancer Research.* 7: 1350-1357.
- Misdorp W., Else R.W. & Hellmén E. 2001. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. *Veterinay Pathology.* 38(6): 733.
- Moll R., Franke W.W., Schiller D.L., Geiger B. & Krepler R. 1992. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell.* 31: 11-24.
- Mottolese M., Morelli L. & Agrimi U. 1994. Spontaneous canine mammary tumors: A model for monoclonal antibody diagnosis and treatment of human breast cancer. *Laboratory Investigation.* 71: 182-187.
- Owen L.N. 1980. TNM classification of tumors in domestic animals. World Health Organization. Geneva. 26-32.
- Patsikas M.N. & Dessiris A. 1996. The lymph drainage of the mammary glands in the bitch: a lymphographic study. Part I: the 1st, 2nd, 4th and 5th mammary glands. *Anatomy, Histology, Embryology.* 25: 131-138.
- Peña L., Gama A., Goldschmidt M.H., Abadie J., Benazzi C., Castagnaro M., Díez L., Gärtner F., Hellmén E., Kiupel M., Millán Y., Miller M.A., Nguyen F., Poli A., Sarli G., Zappulli V., Mulas J.M. 2013. Epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. *Veterinary Pathology.* 10: 1-19.
- Peleteiro M.C. 1994. Tumores mamários na cadela e na gata. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias.* 89: 10-29.
- Pinheiro L.G.P., Filho R.S.O., Vasques P.H.D. et al. 2009. *Acta Cirurgica Brasileira.* 24: 432-436.

- Ramos-Vara J.A., Miller M.A. 2014. When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry – the red, brown, and blue technique. *Veterinary Pathology*. 51: 42-87.
- Rivera P., Eulers H. 2011. Molecular biological aspects on canine and human mammary tumors. *Veterinary Pathology*. 48: 132-146.
- Ronnov-Jessen L., Petersen O.W. & Bissell M.J. 1996. Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. *Physiological Reviews*. 76: 69-125.
- Ruiz, F.S., Alessi, A.C., Chagas, C.A. et al. 2005. Immunohistochemistry in diagnostic veterinary pathology: a critical review. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 41: 263-270.
- Russo J., Gusterson B.A. & Rogers A.E. 1990. Biology of disease. Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Laboratory Investigation*. 62: 244-78.
- Santos A.A., Lopes C.C., Ribeiro J.R. et al. 2013. Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. *Veterinary Research*. 9(1): 1-11.
- Sobin L.H., Gospodarowick, M.K., Wittekind C.H. 2009. TNM classification of malignant tumours, 7th edn., Wiley-Blackwell, 336p.
- Sorenmo K. 2003. Canine mammary gland tumors. *The Veterinary Clinics Small Animal Practice*. 33: 573-96.
- Sorenmo, K., Rasotto, R., Zappulli, V. et al. 2011. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Veterinary Pathology*. 48: 85-97.
- Sautet J.Y., Ruberte J., Lopez C. et al. 1992. Lymphatic system of the mammary glands in the dog: An approach to the surgical treatment of malignant mammary tumours. *Canine Practice Surgery*. 17: 30-33.
- Stavros A.T. 2006. Ultra-sonografia da Mama. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 783-822.
- Taylor C.R. 1994. The current role of immunohistochemistry in diagnostic pathology. *Advances in Pathology and Medicine*. 7: 59-63.
- Taylor C.R., Shi S.R., Barr N.J. et al. 2002. Techniques of immunohistochemistry: principles, pitfalls and standardization. In: Dabbs D.J. *Diagnostic Immunohistochemistry*, New York, Churchill-Livingstone.
- Teixeira, M.J., Sobral, A.P.V., Abreu-e-Lima, M.C.M. et al. 2011. Avaliação da supressão da proteína p53 e das mutações no exón 8 do gene TP53 em carcinomas mamários caninos e glândulas normais. *Pesq. Vet. Bras.* 31(6): 521-526.
- Thuróczy J., Reisvaag G.J.K., Perge E. et al. 2007. Immunohistochemical detection of progesterone and cellular proliferation in canine mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology*. 137: 122-129.
- Tsiapali E., Schmidt M.M., Dizon D. et al. 2011. Patterns of cellular distribution with the sentinel node positive for breast cancer. *International Journal of Breast Cancer*.

- Toríbio J.M.M.L., Lima A.E., Filho E.F.M. et al. 2012. Caracterização clínica, diagnóstico histopatológico e distribuição geográfica das neoplasias mamárias em cadelas de Salvador, Bahia. Revista Ceres de Viçosa. 59: 427-433.
- Viale G., Bosari S., Mazzarol G. et al. 1999. Intraoperative examination of axillary sentinel lymph nodes in breast carcinoma patients. Cancer. 85 (11): 2433-2438.
- Wong S.L., Chao C., Edwards M.J. et al. 2001. The use of cytokeratin staining in sentinel lymph node biopsy for breast cancer. American Journal of Surgery. 182: 330-334.
- Xavier J.G. 2005. Imunoistoquímica, uma poderosa ferramenta em oncologia. Anais do 5º Congresso Paulista de Clínicos de Pequenos Animais. 42-43.
- Zaninovic P., Simcic V. 1991. Epidemiology of mammary tumours in dogs, Z. B. Vet Fak. 1: 57-72.
- Zuccari D.A.P.C., Santana A.E. & Rocha N.S. 2001. Fisiopatologia das neoplasias mamárias de cadelas. Clínica Veterinaria. 32: 50-54.

2. ARTIGO

Abordagem imuno-histoquímica aprimora a identificação de micrometástases nodais em cães portadores de carcinomas mamários

V.S.COELHO^{1,2}, J.G.XAVIER^{2,3}

1. Médico-veterinário do Hospital Público Veterinário da Anclivepa-SP

2. Universidade Paulista - UNIP, São Paulo

3. Universidade Metodista de São Paulo - Umesp, São Paulo

ABSTRACT. - V.S.COELHO, J.G.XAVIER 2013. [**Immunohistochemical approach improves detection of nodal micrometastasis in dogs with mammary carcinomas.**] Abordagem imuno-histoquímica aprimora a detecção de micrometástases em linfonodos de cães portadores de carcinomas mamários.

Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Paulista, SP, 04026-002, Brazil. E-mail:
xavier2126@gmail.com

Spontaneous mammary tumors are the most common neoplasms in the intact adult female dog. The malignant tumors account for up to 50% of cases, that frequently metastasizes to regional lymph nodes, lungs, liver, kidneys and, less frequently, bones. In human breast pathology immunohistochemistry is routinely used with diagnostic, prognostic and predictive purposes. The aim of this study was to compared immunolabelling of histological specimens with conventional staining in the detection of nodal micrometastases from dogs with mammary carcinoma. A series of 51 lymph nodes from 47 dogs with carcinomas were evaluated by staining with haematoxylin and eosin and immunohistochemically for antibodies to pan-keratin. The immunohistochemical test detected occult micrometastases in 6,8% of the lymph nodes previously negative by haematoxylin and eosin staining. This study indicated the value of immunohistochemical labelling for the detection of epithelial metastases in canine lymph node samples.

INDEX TERMS: dog, immunohistochemistry; lymph nodes; mammary tumor; micrometastases

Introdução

A longevidade dos cães aumentou nos últimos anos graças ao aprimoramento das técnicas de manejo e ao desenvolvimento da biotecnologia, otimizando o diagnóstico, prevenção e terapêutica aplicados aos animais de companhia. Em consequência, doenças associadas ao envelhecimento, como o câncer, passaram a integrar a lista das principais morbidades nesses animais (Matos et. al 2012). O aumento da demanda representou impulso para a pesquisa na área oncológica veterinária, buscando-se amplificar a acurácia diagnóstica, prognóstica e terapêutica (Ruiz 2005). Em cães, os tumores de mama estão entre os problemas clínicos mais frequentes, compreendendo cerca de metade das neoplasias de cadelas adultas (Brodey et al. 1983, Karayannopoulou et al. 2005, Sorenmo et al., 2011, Peña et. al 2013, Santos et. al 2013), havendo grande disparidade entre a proporção de carcinomas, de acordo com amostragens, compreendendo de 28% a 91% dos casos relatados. A disseminação dos tumores mamários relaciona-se à invasão local, disseminação pelo sistema linfático e eventualmente sanguíneo, produzindo colonização de linfonodos, de tecido subcutâneo (metástase linfática retrógrada), e de territórios a distância, sendo os pulmões os mais frequentemente comprometidos (Macewen &Withrow 2001, Sorenmo 2011). A circulação linfática ocorre paralelamente às duas cadeias mamárias, inexistindo comunicação entre elas, destacando-se como principais linfonodos regionais os inguinais, que drenam as mamas inguinais, abdominais caudais e 30% das abdominais craniais e os axilares, responsáveis pela drenagem de 70% das mamas abdominais craniais, além das torácicas craniais e caudais. (Peleteiro 1994, Patsikas & Dessiris 1996). Assim, as metástases são mais frequentemente observadas em linfonodos intramamários, satélites e regionais e parênquima pulmonar (Karayannopoulou et al. 1980, Gilbertson et al. 1983, Sorenmo 2003, Peña et. al 2013).

O prognóstico em carcinomas mamários depende das dimensões do tumor, da classificação histológica, do padrão de crescimento e do estadiamento clínico (Hellmén et al.

1993, Macewen & Withrow 2001). É crescente a remoção conjunta da formação mamária e do linfonodo associado, pois a condição dos linfonodos sentinelas e regionais é fundamental para o estabelecimento do estadio clínico (Wong et al. 2001, Sorenmo 2003, Karayannopoulou et al. 2005, Sabin et al. 2009).

Um desafio no estadiamento relaciona-se à identificação, em linfonodos, de micrometástases, colônias de células neoplásicas atingindo de 0,2 a 2,0 mm, nem sempre possível apenas com o exame de cortes corados pela hematoxilina-eosina, em especial pela elevada densidade celular local (Hellmén et al. 1993). O uso de marcadores imuno-histoquímicos para a pesquisa de células epiteliais no parênquima linfoide pode contribuir, destacando-se o emprego da pan-ceratina. As ceratinas, anteriormente referidas como citoceratinas (Schweizer et al. 2006), formam um grupo de filamentos intermediários integrantes do citoesqueleto, expressas principalmente por células epiteliais, apresentando diferenças quanto ao peso molecular. O emprego de marcadores para grupos de ceratinas, como o anticorpo anti-pan-ceratina, clone AE1/AE3, no qual AE1 reage contra as ceratinas ácidas 10, 14 15 e 16 e AE3 com as ceratinas básicas, é útil no rastreamento de células epiteliais (Moll et al 1982). Em Medicina Humana, metástases ocultas são detectadas em 9% a 42% dos pacientes portadores de carcinomas mamários por meio da imunomarcação (Boer et al., 2010). Em Medicina Veterinária, avaliações dessa natureza são escassas, tendo revelado incremento no diagnóstico de micrometástases nodais de 6,8% em amostras citológicas (Hoinghaus et al 2007) e de 9,2% em fragmentos teciduais (Matos et al 2006). No presente estudo buscou-se comparar os métodos histológico convencional e imuno-histoquímico na detecção de micrometástases nodais de carcinomas mamários de cadelas atendidas no Hospital Veterinário da Umesp.

Material e Métodos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Umesp, sob protocolo 218-07. A partir dos arquivos do Serviço de Patologia do Hospital Veterinário da Universidade Metodista de São Paulo – Umesp, foram selecionados 47 casos de cadelas portadoras de carcinoma mamário que sofreram a excisão cirúrgica da formação tumoral e de ao menos um linfonodo regional, obtendo-se o total de 51 amostras de linfonodos. As amostras teciduais passaram por fixação em formol a 10% e foram submetidas a processamento histológico de rotina, realizando-se cortes de aproximadamente 4 μ m., corados pelo método de hematoxilina-eosina. Os linfonodos foram seccionados em seu maior eixo, sendo realizados cortes seriados.

As lesões mamárias foram classificadas de acordo com o sistema proposto pela Organização Mundial de Saúde (Misdorp 1999). Em sequência foram graduados seguindo o método proposto por Elston & Ellis, 1991, para neoplasias mamárias humanas, utilizando como parâmetros a formação de túbulos, o pleomorfismo nuclear e a atividade mitótica.

A pesquisa de micrometástases foi realizada em cortes de linfonodo corados com anticorpo anti-pan-ceratina AE1/AE3 (Laboratórios Zymed), na diluição de 1:400. Seguiu-se a incubação com anticorpo secundário e o complexo estreptavidina-peroxidase (LSAB, DAKO). Para a revelação foi empregada solução contendo cromógeno diaminobenzidina. A imunomarcação seguiu a metodologia descrita por Hsu et al, 1981, e as neoplasias mamárias funcionaram como controles-positivos.

Procedeu-se à comparação entre a sensibilidade dos métodos convencional e imuno-histoquímico na detecção de micrometástases em linfonodos com o emprego de uma tabela de contingência 2X2 (Berquó 2001), calculando-se a sensibilidade e a especificidade dos métodos, considerando-se o método imuno-histoquímico como o exame de referência.

Resultados

Dentre os casos avaliados predominaram formações em animais sem raça definida, sendo a idade média de acometimento de 9,75 anos, próxima à idade média dos portadores de micrometástases nodais, de 9,8 anos. Os linfonodos inguinais foram os mais amostrados, compondo 32 das 47 amostras com origem informada. Houve a classificação histopatológica e a graduação das formações, seguindo-se a pesquisa de metástases em território linfoide, em cortes corados pela hematoxilina-eosina e por anticorpos anti-pan-ceratina. Os resultados obtidos estão sumarizados no quadro 1. Os tipos tumorais encontrados foram: carcinomas tubulares propriamente ditos, carcinomas tubulares variante cístico-papilífera e carcinomas sólidos, identificando-se proliferações simples, complexas e mistas, com graus histológicos variando de I a III. Nos neoplasmas tubulares a incidência de colonização nodal foi de 18%, sendo o único caso de crescimento sólido acompanhado de metástase linfoide. Considerando-se a expansão mioepitelial, merece referência a ausência de micrometástases em casos de cães portadores de carcinomas complexos, enquanto nos carcinomas simples esse evento alcançou 28,6% dos casos. Em relação ao grau histológico, evidenciou-se um paralelismo entre graduação e frequência de envolvimento nodal, sendo esta, respectivamente, de 11%, 18% e 100%, respectivamente nos carcinomas de graus I, II e III.

Quadro 1 Relação de casos avaliados, considerando-se os dados do animal, classificação e graduação tumorais e a pesquisa de metástases em linfonodos

Caso	Raça	Registro interno	Idade (anos)	Classificação Histológica	Grau	Linfonodo	Metástase linfóide	
							HE	AE1/AE3
01	SRD	H 1181	12	Tubular Simples Misto	II	inguinal	+	+
02	Poodle	H1218	4	Túbulo Papilífero Simples	II	-	-	-
03	Poodle	H1228	10	Cístico Papilífero Complexo	II	-	-	-
04	Sheepdog	H1387	8	Tubular Simples	I	-	-	-
05	Doberman	H1410	8	Túbulo Papilífero Simples	I	-	-	-
06	Dachshund	H683	10	Sólido Simples	III	axilar	+	+
07	SRD	H1050	8	Cístico Papilífero Simples	II	-	-	-
08	Poodle	H1090	5	Cístico Papilífero Simples	I	axilar	-	-
09	SRD	H168	-	Cístico Papilífero Simples	III	inguinal	+	+
10	SRD	H174	15	Tubular Misto	III	inguinal	+	+
11	SRD	H195	11	Tubular Simples	I	-	-	-
12	SRD	H249	-	Tubular Cístico	I	inguinal	-	-
13	SRD	H275	-	Tubular Simples	III	axilar	+	+
14	SRD	H331	10	Tubular Simples	I	-	+	+
15	Labrador	H465	8	Tubular Simples	I	inguinal	-	-
16	SRD	H512	8	Tubular Simples Misto	I	-	+	+
17	SRD	H515	-	Tubular Simples	II	inguinal	-	-
18	Husky	H517	9	Tubular Simples	I	-	-	-
19	Beagle	H575	9	Cístico Papilífero Simples	I	inguinal	-	-
20	SRD	H1453	9	Túbulo Papilífero Misto	I	-	-	-
21	SRD	H1456	11	Túbulo Papilífero Complexo	I	inguinal	-	-
22	SRD	H1458	15	Túbulo Papilífero Complexo	I	inguinal	-	-
23	SRD	H1489	4	Tubular Simples	I	axilar	-	-
24	SRD	H1498	11	Túbulo Papilífero Simples	I	-	-	+
25	Setter	H1515	10	Tubular Complexo	I	inguinal	-	-
26	Poodle	H1558	8	Túbulo Papilífero Misto	I	inguinal	-	-
27	SRD	H3279-B	10	Tubular complexo	I	inguinal	-	-
28	SRD	H3536	8	Tubular simples	I	inguinal	-	-
29	Pit Bull	H3224-B1	12	Tubular complexo	I	inguinal	-	-
30	Pit Bull	H3224-B2	12	Tubular complexo	I	inguinal	-	-
31	Pit Bull	H3224-B3	12	Tubular complexo	I	inguinal	-	-
32	Pit Bull	H3224-B4	12	Tubular complexo	I	inguinal	-	-
33	Poodle	H3306	6	Tubular complexo	I	inguinal	-	-
34	Dachshund	3267-A2	7	Tubular simples	I	inguinal	-	+
35	Dachshund	H3267-B	7	Tubular simples	I	inguinal	-	-
36	SRD	H3533	6	Tubular simples	I	inguinal	-	-
37	Pinscher	H1561	9	Cístico Papilífero Misto	II	inguinal	-	-
38	SRD	H1581	13	Tubular Simples	II	-	-	-
39	Poodle	H1584	8	Cístico Papilífero Simples	I	axilar	-	-
40	SRD	H1560	10	Cístico papilífero simples misto	I	inguinal	-	-
41	poodle	H3414	6	Tubular complexo	I	inguinal	-	-
42	cocker	H3464	13	Tubular complexo	I	inguinal	-	-
43	SRD	H3468	12	Tubular complexo	I	inguinal	-	-
44	maltês	H3490-2	8	Tubular simples	II	-	-	-
45	poodle	H3616	-	Tubular complexo	I	inguinal	-	-
46	poodle	H3618	7	Tubular simples	I	inguinal	-	-
47	SRD	H3643	-	Tubular complexo	I	inguinal	-	-
48	poodle	H3560-6	19	Tubular simples	II	inguinal	-	+
49	Dogue alemão	H3557-3	9	Tubular complexo	II	inguinal	-	-
50	SRD	H3564-13	12	Tubular simples	I	inguinal	-	-
51	maltês	H34490-1	8	Tubular simples	II	-	-	-

Em cortes de linfonodos corados pela hematoxilina-eosina, identificou-se elevada densidade celular, dificultando a detecção de eventuais células invasoras (figura 1). Constatou-se a colonização de tecido linfoide por células neoplásicas em 7 linfonodos (figuras 2 e 3), correspondendo a 13,7 % dos casos estudados, sendo a maior incidência em carcinomas grau III de malignidade, sempre acompanhados por micrometástases.

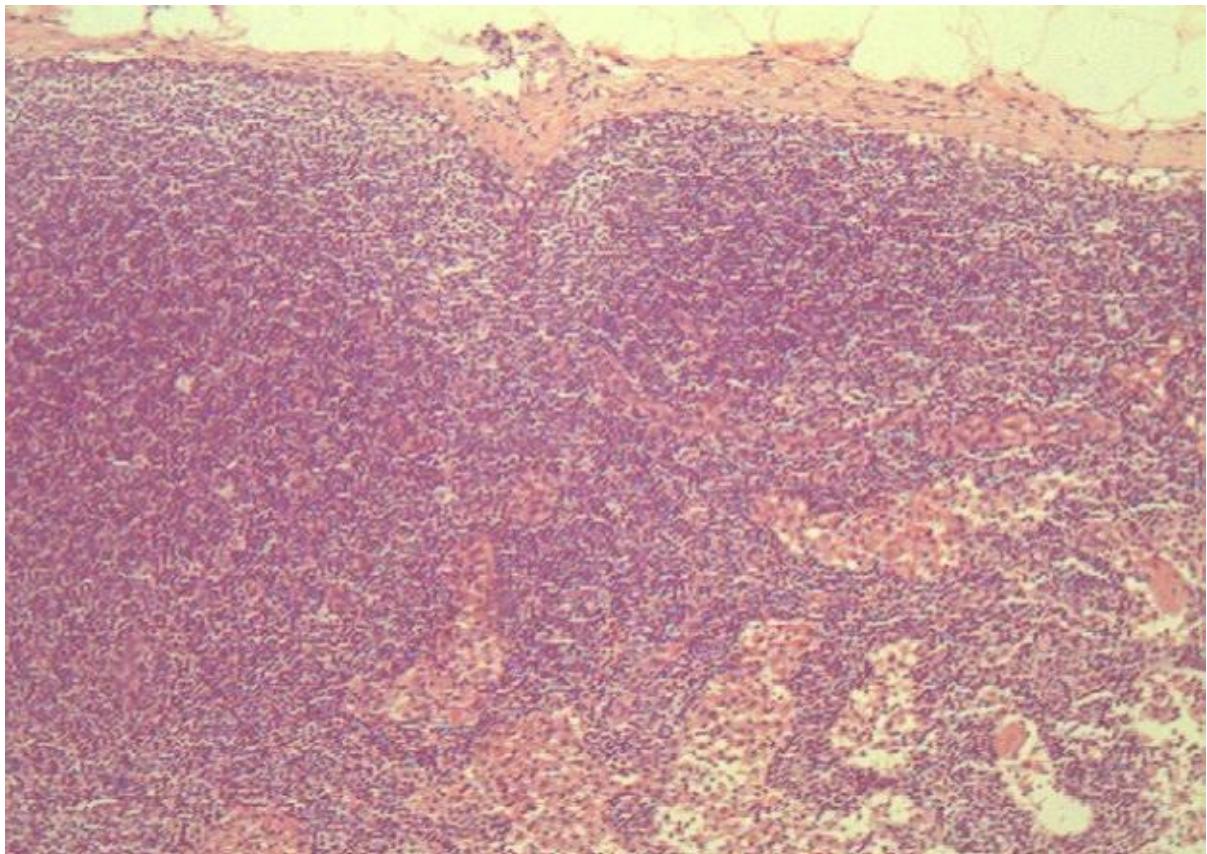


Figura 1. Fotomicrografia de corte histológico de linfonodo regional de cadela portadora de carcinoma mamário, apresentando intensa celularidade cortical e discreta distensão sinusal. Ausência de tecido neoplásico. Hematoxilina-eosina, 10x.

Com o emprego de imunomarcação, constatou-se a presença de colônias de células neoplásicas em parênquima linfoide em 10 casos (figuras 4 e 5), correspondendo a 19,6% do total de casos avaliados.

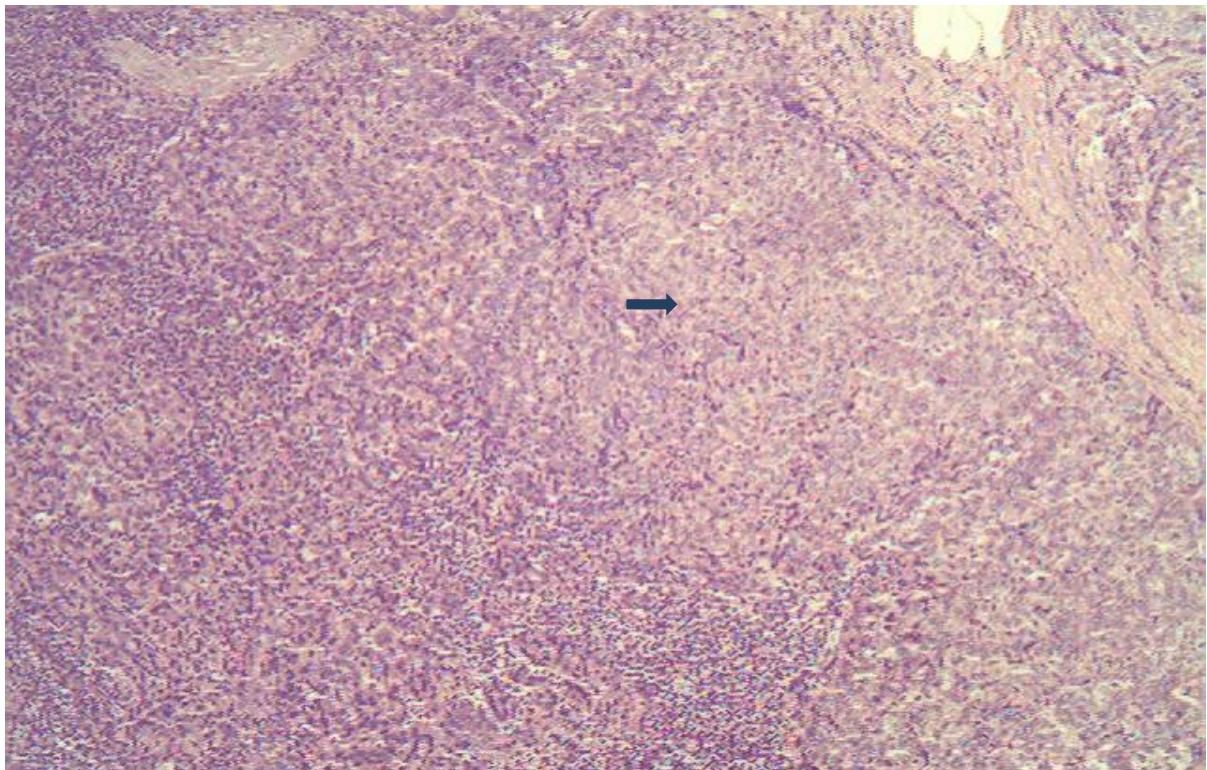


Figura 2. Fotomicrografia de corte histológico de linfonodo regional de cadela portadora de carcinoma mamário, exibindo colonização cortical por população de células neoplásicas, apresentando plemorfismo e agregação sólida (seta). Hematoxilina-eosina, 10x.

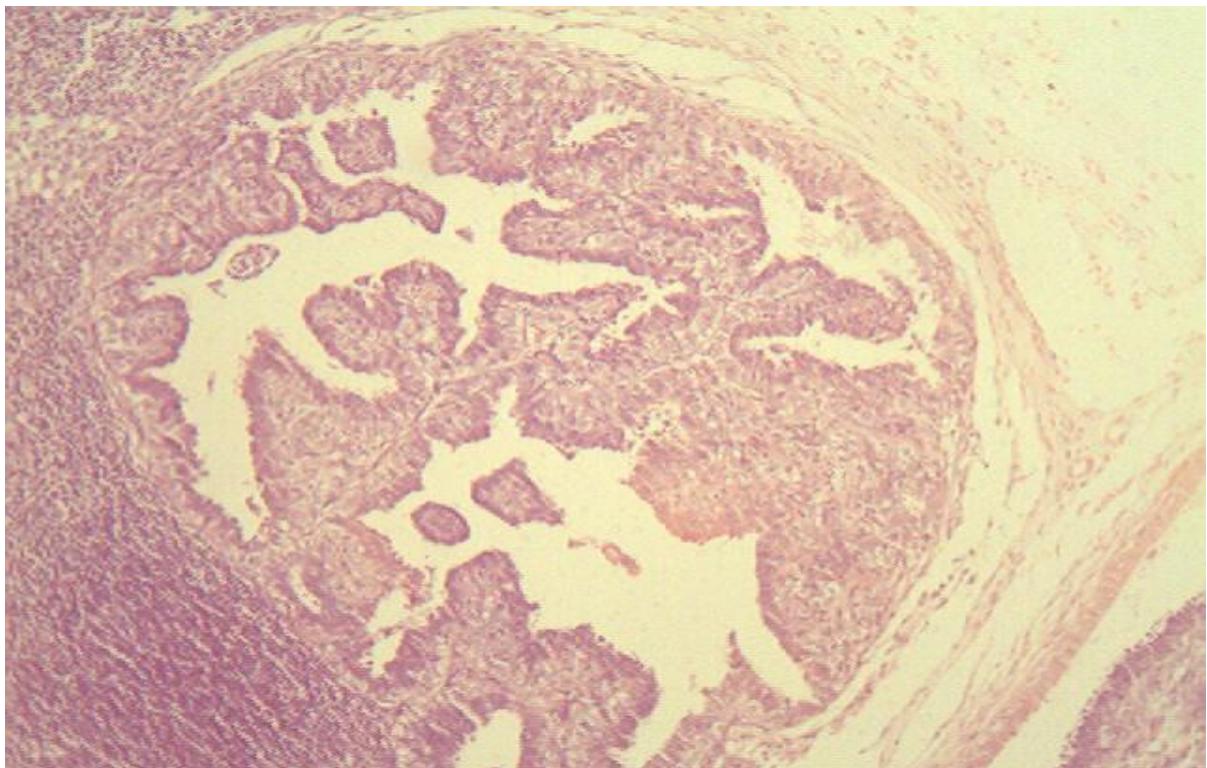


Figura 3. Fotomicrografia de corte histológico de linfonodo regional de cadela portadora de carcinoma mamário, exibindo colonização metastática em tecido linfoide, apresentando padrão cístico-papílico. Hematoxilina-eosina, 10x.

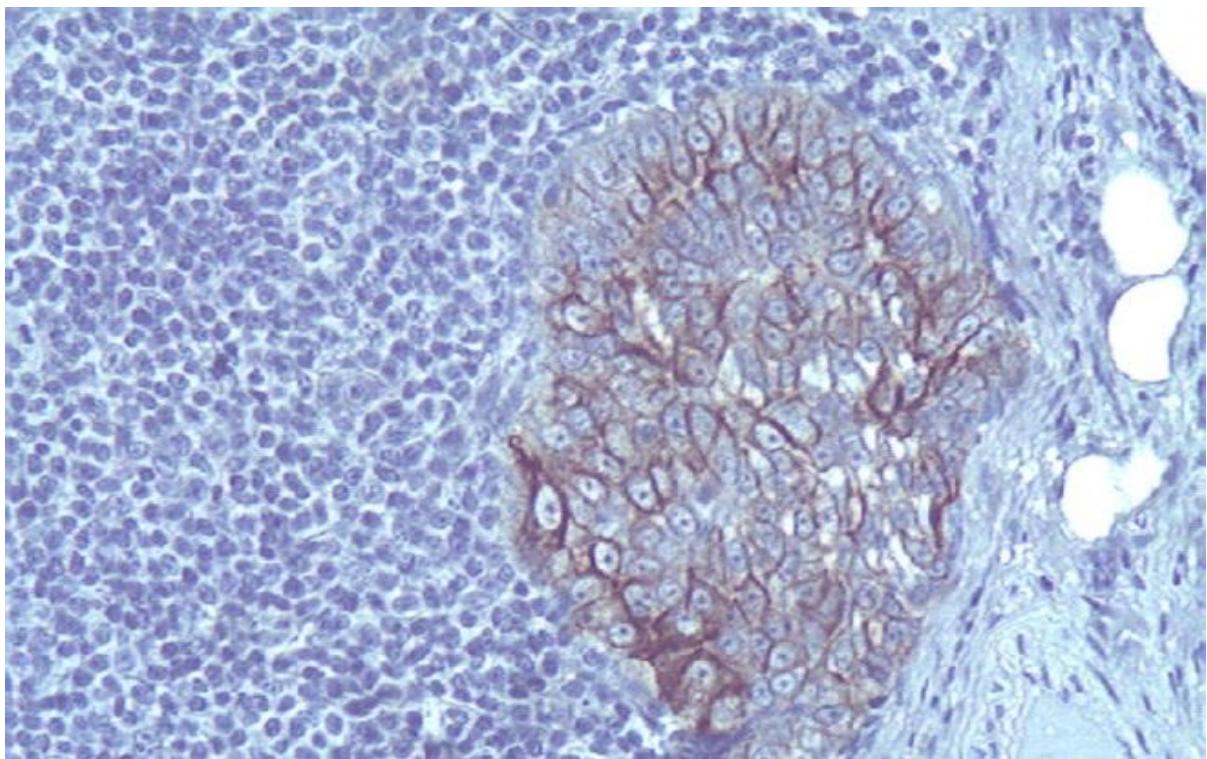


Figura 4. Fotomicrografia de corte histológico de linfonodo regional de cadela portadora de carcinoma mamário, exibindo colônia de células neoplásicas AE1-AE3+. LSAB contacorado com hematoxilina, 40x.

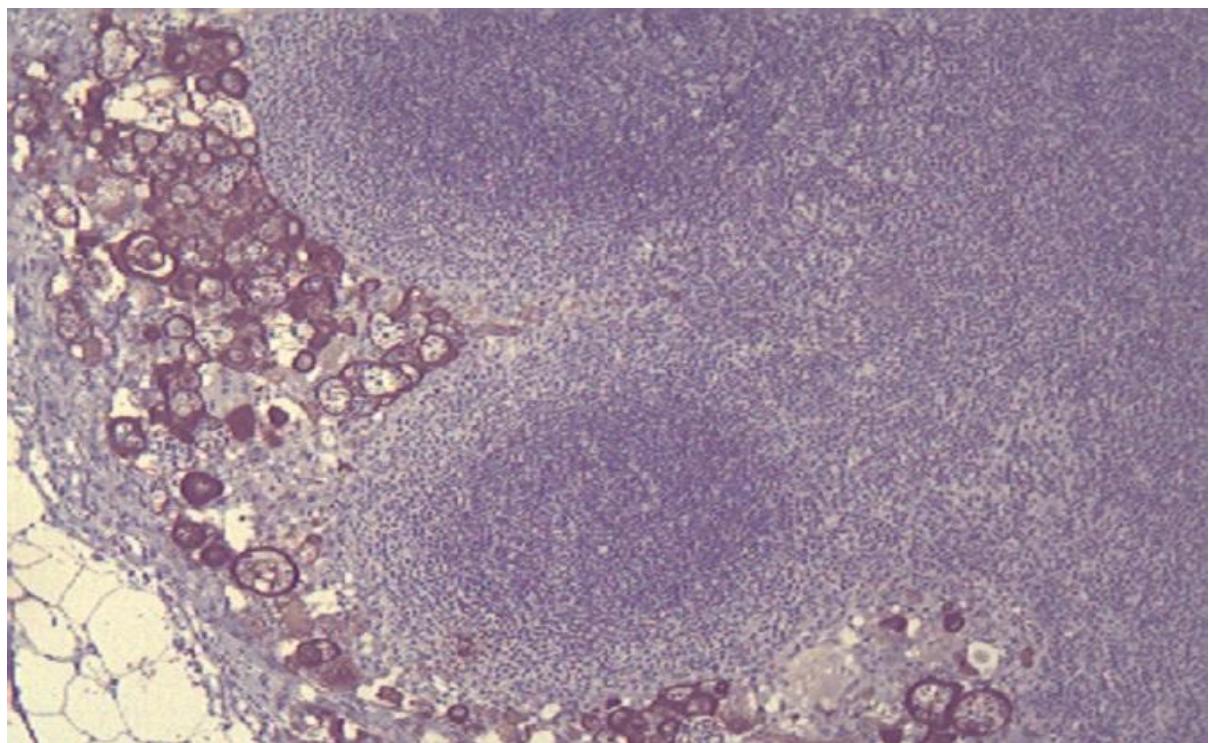


Figura 5. Fotomicrografia de corte histológico de linfonodo regional de cadela portadora de carcinoma mamário, exibindo elevada densidade de células neoplásicas AE1-AE3+ povoando seio subcapsular. LSAB contracorado com hematoxilina, 10x.

Os cortes em que se observou a presença de células neoplásicas restritas ao sistema sinusal linfoide, com ausência de infiltração neoplásica em parênquima linfoide, não foram caracterizados como metastáticos, conforme orientação de Sabin & Wittekind, 2002, admitindo que nessas situações as células neoplásicas estão em circulação.

Comparando-se a imuno-histoquímica com a histologia convencional identificou-se um aumento de 5,9% nos resultados positivos. Assim, houve concordância de resultados na pesquisa de micrometástases em 94,1% dos cortes examinados. Se considerarmos apenas os casos inicialmente considerados livres de metástases, a avaliação imuno-histoquímica revelou a presença de micrometástase oculta em 6,8% das amostras.

Tomando-se a imuno-histoquímica como procedimento diagnóstico de referência, o método convencional apresentou sensibilidade de 70,0% e valor preditivo negativo de 93,2%.

Em alguns cortes submetidos à imunomarcação, foi observada população sinusal marcada intracitoplasmaticamente em padrão granular, distintamente da coloração homogênea observada para citoceratinas, correspondendo a histiocitos (figura 6).

Um dos linfonodos inicialmente diagnosticados como livre de células neoplásicas, que apresentou discreta colônia de células tumorais positivas para AE1-AE3 à avaliação imuno-histoquímica, foi reavaliado pelo método convencional e não foram detectadas colônias nos cortes corados pela hematoxilina-eosina.

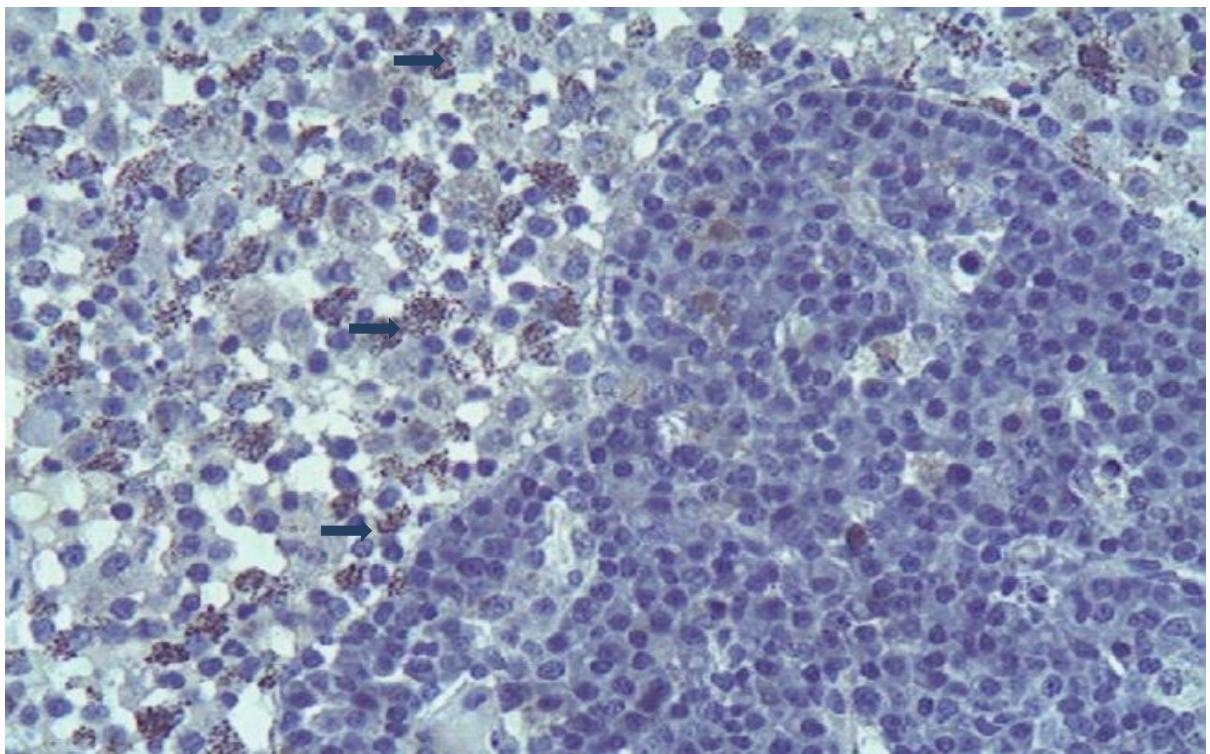


Figura 6. Fotomicrografia de corte histológico de linfonodo regional de cadela portadora de carcinoma mamário, apresentando histiócitos albergando debríis citoplasmáticos castanhos simulando imunopositividade (setas). LSAB contracororado com hematoxilina, 40x.

Discussão

Foram selecionados para o estudo casos de cadelas portadoras de carcinomas mamários, nas quais se optou pela retirada cirúrgica da formação mamária e de ao menos um linfonodo regional. Corroborando os dados de literatura que referem a ausência de predisposição racial, predominaram animais sem raça definida e poodles, provável reflexo da distribuição racial da população canina local (Peleteiro 1994, Cavalcanti & Cassali, 2006). A idade das cadelas estudadas variou entre 4 a 19 anos, sendo a idade média de 9,7 anos, acompanhando a média esperada para essa condição, que indica maior concentração de casos de neoplasias mamárias em cadelas entre 9 e 11 anos (Benjamin et al. 1999, Cassali 2002, De Nardi et al. 2007).

Confirmando a relação entre graduação histológica e agressividade biológica, identificou-se incidência crescente de micrometástases em função do grau histológico do tumor primário, observando-se disseminação linfoide em todos os casos de carcinomas de grau III. Merece destaque a ausência de colonização nodal em tumores complexos, casos em que há expansão mioepitelial, reforçando estudos que referem menor agressividade biológica nessas condições (Misdorp 2002). Matos et al., 2006, observaram, dentre 44 amostras positivas para células carcinomatosas em linfonodos, apenas duas contendo população mioepitelial.

Dentre os diversos fatores prognósticos em tumores mamários caninos está, além do tamanho tumoral e do padrão e grau histológicos, a condição dos linfonodos, informação também central para o estadiamento do paciente (Sorenmo 2003, Karayannopoulou et al. 2005).

O comprometimento nodal pode envolver macrometástases, micrometástases e ninhos isolados de células tumorais, estando a detecção das duas últimas condições relacionadas a uma adequada representação e abordagem histopatológica. Segundo Wong et al., 2001, na espécie humana o tecido linfoide histologicamente representado

corresponde a aproximadamente 1% da totalidade dos linfonodos, sendo fundamental a realização de cortes seriados para o aumento da representatividade da amostra histológica, pois o completo rastreamento de colônias metastáticas em linfonodos envolveria a avaliação de 330 a 500 cortes por linfonodo (Weaver 2009), procedimento inviável em condições de rotina. Pargaonkar et al., 2003, evidenciaram acréscimo na detecção de micrometástases mediante a adição de novos níveis de secção da amostra histológica, porém sem chegar a uma indicação precisa de nível ideal de amostragem. Recentemente, Peña et al., 2013, recomendaram a emblocagem dos linfonodos em fatias de no máximo 2mm, a partir das quais devem ser feitos cortes seriados, independentemente da existência de alterações macroscópicas. Corroborando essas indicações, em nosso estudo um dos linfonodos inicialmente diagnosticados como livres de células neoplásicas apresentou discreta colônia de células tumorais positivas para AE1-AE3 à avaliação imuno-histoquímica. A amostra original foi reavaliada pelo método convencional e não foram detectadas colônias nos cortes corados por hematoxilina-eosina, sugerindo a necessidade de maior representação do tecido. Em relação ao padrão de crescimento neoplásico, os tumores sólidos se distanciam da arquitetura original mamária, aproximando-se da arquitetura linfoide, representando um desafio diagnóstico em cortes corados pela hematoxilina-eosina (Macewen et al. 1985). Em consequência dessas limitações, novas formas de pesquisa são propostas para incrementar a detecção de micrometástases linfoides, como a utilização de métodos imuno-histoquímicos, possibilitando a marcação específica de células epiteliais em território linfoide. Estudos dessa natureza são numerosos em Medicina Humana (Czerniecki et al. 1999, Wong et al. 2001, Cohen et al. 2002, Sabin et al. 2009), sendo recentemente relatadas as primeiras abordagens em cães (Matos et al. 2006, Hoinghaus et al. 2007). Alternativamente, alguns pesquisadores empregam protocolos de biologia molecular, como o RT-PCR, para a pesquisa de células neoplásicas no tecido linfoide, sendo a ausência de referência morfológica uma limitação do procedimento (Pegolo et al. 2013).

O significado biológico das micrometástases em carcinomas mamários ainda é

incerto, existindo uma tendência a admitir-se a condição de doença generalizada a partir de mínima invasão neoplásica em tecido linfoide (Izbicki et al. 2002), pois apresenta caráter prognóstico em carcinomas de esôfago, estômago e pâncreas na espécie humana (Maehara et al. 1996, Hosch et al. 1997). Szczubial & Lopuszynski., 2011, evidenciaram relação entre macrometástases e sobrevida em cadelas com carcinomas mamários. Já a identificação de grupos isolados de células tumorais em parênquima linfoide parece não interferir na evolução clínica do paciente oncológico (Sloothaak 2013).

Em nosso estudo, a imunomarcação foi capaz de elevar a sensibilidade do método diagnóstico, determinando aumento de 5,9% no número de casos com micrometástases em linfonodos. Tais achados corroboram os dados de outros autores, que evidenciaram um incremento em 9,2% e 6,8%, respectivamente, de tumores metastáticos em linfonodos previamente diagnosticados como livres de células tumorais pela histopatologia convencional (Matos et al 2006, Hoinghaus et al. 2007).

Deve-se ressaltar o cuidado na interpretação da imunomarcação, pois as células metastáticas devem ser diferenciadas de células reticulares ceratina-positivas e de partículas ceratina-positivas isoladas (Domagala et al. 1992; Doki et al. 2002), além da frequente marcação inespecífica no citoplasma de histiócitos, assumindo aspecto granular, o que permite a distinção em relação à coloração mais homogênea de componentes do citoesqueleto. Inclusões glandulares benignas, formando discretos agregados de células epiteliais eventualmente acompanhadas por mioepitélio em cápsula nodal, são outro potencial fator de erro, porém essas estruturas ainda não foram descritas na espécie canina (Hicks 2011).

Nas situações em que células neoplásicas restringiram-se ao sistema sinusal, os animais foram considerados livres de crescimento metastático, conforme recomendação da Organização Mundial de Saúde (Sobin et al. 2009). No entanto, essa interpretação é controversa. Hartveit & Lilleng, 1996, identificaram pior prognóstico em pacientes com colonização restrita ao sistema sinusal de linfonodos, em comparação com aqueles que

apresentavam focos de crescimento tumoral metastático de carcinoma mamário em parênquima de linfonodo. Khalifa & Smith, 2009, sugerem que a presença de células tumorais em estruturas sinusais equivale, em termos prognósticos, a colônias parenquimatosas. A partir dessa interpretação a abordagem molecular das micrometástases ganha novo significado, considerando-se a maior sensibilidade e especificidade inerentes ao método quando comparado à imuno-histoquímica, o que possivelmente explica a relação entre micrometástases nodais detectadas por RT-PCR e pior prognóstico em pacientes portadores de carcinoma mamário (Iddings et al 2006).

Considerando-se a abordagem imuno-histoquímica, uma possível fonte de casos falso-

negativos relaciona-se a carcinomas altamente invasivos, dada a possível perda da expressão de ceratinas nas células neoplásicas durante a chamada transição epitelial-mesenquimal. Biologicamente, a redução na expressão de ceratinas torna a célula mais flexível, o que potencializa sua atividade invasora e migratória (Seltmaan et al. 2013).

Assim, estudos prospectivos envolvendo aprimoramento na detecção de micrometástases linfoides são fundamentais para aclarar a relação esses eventos e o prognóstico em cães portadores de carcinomas mamários, possibilitando o adequado estadio e tratamento desses animais.

Conclusão

O emprego da imunomarcação na pesquisa de micrometástases de carcinoma mamário em linfonodos de cães determinou aumento de sensibilidade no procedimento em relação à histopatologia convencional, sugerindo sua indicação como método diagnóstico complementar nessas condições, aperfeiçoando o estadio e a abordagem terapêutica dos pacientes oncológicos.

Referências

- Benjamin S. A., Lee A. C., Saunders W. J. 1999. Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in Beagles. *Veterinary Pathology*. 36: 423-436.
- Berquó E.S., Souza J.M.P., Gotlieb S.L.D. 2001. Bioestatística. 2. ed. São Paulo: E.P.U.. 350 p.
- Boer M., Dijck A. A. M., Bult P. et al. 2010. Breast cancer prognosis and occult lymph node metastases, isolated tumor cells, and micrometastases. *Journal National Cancer Institute*. 102: 410-425.
- Brodey R. S., Goldshmidt M. H. & Roszel J. R. 1983. Canine mammary gland neoplasms. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 19: 61-90.
- Cassali G. D. 2002. Patologias da Glândula Mamária. p. 119-133. In: Nascimento E. F., Santos R.L. (Ed) *Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Cavalcanti M. F., Cassali G. D. 2006. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas – revisão. *Revista Clínica Veterinária*. 61: 56-63.
- Cohen C., Alazraki N., Stublo T. et al, T. 2002. Immunohistochemical evaluation of sentinel lymph nodes in breast carcinoma patients. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology*. 10: 296-303.
- Czerniecki B. J., Scheff A. M., Callans L .S. et al. 1999. Immunohistochemistry with pancytokeratin improves the sensitivity of sentinel lymph node biopsy in patients with breast carcinoma. *Cancer*. 85: 1098-1103.
- De Nardi A. B. 2007. Correlação da ciclooxygenase-2 com Ki-67, P53 e caspase-3 nas neoplasias de mama em cadelas. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 92p.
- Doki Y., Ishikawa M., Mano M. et al. 2002. Cytokeratin deposits in lymph nodes show distinct clinical significance from lymph node micrometastasis in human esophageal cancers. *Journal of Surgical Research*. 107: 75-81.
- Domagala W., Bedner E., Chosia M. et al. 1992. Keratin-positive reticulum cells in fine needle aspirates and touch imprints of hyperplastic lymph nodes. A possible pitfall in the immunocytochemical diagnosis of metastatic carcinoma. *Acta Cytologica*. 36: 241-245.
- Elston C.W., Ellis I.O. 1991. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 19: 403-10.
- Gilbertson S. R., Kurzman I. D. & Zacharau R. E. 1983. Canine mammary neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Veterinary Pathology*. 20: 127-42.
- Hartveit F., Lilleng P. K. 1996. Breast cancer: two micrometastatic variants in the axilla that differ in prognosis. *Histophatology*. 28: 241-246.

- Hellmén E., Bergström R., Holmberg L. et al. 1993. Prognostic factors in canine mammary tumours: A multivariate study of 202 consecutive cases, *Veterinary Pathology*. 30: 20-27.
- Hicks D.G. 2011. Immunohistochemistry in the diagnosis evaluation of breast lesions. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology*. 19: 501-505.
- Hoinghaus R., Von Wasielewski R., Heiwicker-Trauewein M. et al. 2007. Immunocytological detection of lymph node metastases in dogs with malignant epithelial tumours. *Journal of Comparative Pathology*. 137: 1-8.
- Hosch S. B., Knoefel W. T., Metz S. et al. 1997. Early lymphatic tumor cell dissemination in pancreatic cancer: frequency and prognostic significance. *Pancreas*. 15: 154-159.
- Hsu S. M., Raine L., Fanger H. 1981. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 29: 577-80.
- Iddings D., Ahmad A., Elashoff D. et al. 2006. The prognostic effect of micrometastases in previously staged lymph node negative (N0) colorectal carcinoma: a meta-analysis. *Annals of Surgery Oncology*. 13: 1386-1392.
- Izbicki J. R., Pantel K. & Hosch S. B. 2002. Micrometastasis in solid epithelial tumors: impact on surgical oncology. *Surgery*. 131: 1-5.
- Khalifa M.A., Smith A. 2009. Lymph node assessment: issues in pathology. *Journal of Surgical Pathology*, 99: 260-264.
- Karayannopoulou M., Kaldrymidou E. & Dessiris A. 1980. Some epidemiological aspects of canine mammary tumours treatment and prognosis, *Bulletin of the Hellenic Veterinary Society*. 40: 111-21.
- Karayannopoulou M., Kaldrymidou E., Constantinidis T. C. et al. 2005. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: Application of a human grading method. *Journal Comparative Pathology* 133: 246-252.
- Macewen E. G. & Withrow S. J. 2001. Tumors of the mammary gland. p. 356. In: Macewen E. G. & Withrow S. J. (3Ed.). *Small Animal Clinical Oncology*. Saunders, Philadelphia. 768p.
- Maehara Y., Oshiro T., Endo K. et al. 1996. Clinical significance of occult micrometastasis in lymph nodes from patients with early gastric cancer who died of recurrence. *Surgery*. 119: 397-402.
- Matos A. J. F., Faustino A. M. R. , Lopes C. et al. 2006. Detection of lymph node micrometastases in malignant mammary tumours in dogs by cytokeratin immunostaining. *Veterinary Record*. 158: 626-630.
- Matos, A. J. F., Baptista, C. S., Gärtner, M. F. et al. 2012. Prognostic studies of canine and feline mammary tumours: The need for standardized procedures. *The Veterinary Journal*. 193: 24-31.
- Misdorp, W. 1999 (Ed). *Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat*. Armed Forces Institute of Pathology: American Registry of Pathology: World Health Organization Collaborating Center for Comparative Oncology.
- Misdorp W. 2002. Tumors of the mammary gland. In: Meuten, DJ, ed. *Tumors in Domestic Animals*. 4th ed. Ames: Iowa State Press; 575-606, 764.

- Moll R., Lowe A., Laufer J. et al. 1992. Cytokeratin 20 in human carcinomas. American Journal of Pathology. 140: 427-47.
- Pargaonkar A. S., Beissner R. S., Snyder S. et al. 2003. Evaluation of immunohistochemistry and multiple-level sectioning in sentinel lymph nodes from patients with breast cancer. Archives of Pathology & Laboratory Medicine. 127: 701-705.
- Patsikas M.N. & Dessiris A. 1996. The lymph drainage of the mammary glands in the bitch: a lymphographic study. Part I: the 1st, 2nd, 4th and 5th mammary glands. Anatomy, Histology, Embryology. 25: 131-138.
- Peleteiro M. C. 1994. Tumores mamários na cadela e na gata. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias. 89: 10-29.
- Pegolo E., Puppin C; Gerometta, et al. 2013. One-step nucleic acid amplification for intraoperative evaluation of sentinel lymph node status in breast cancer: a comparative study between CK19 protein expression and CK19 mRNA level in primary tumors and lymph node metastasis. Vircows Archivs, 463: 7-15.
- Peña L., Gama A., Goldschmidt M. H., et al. 2013. Canine mammary tumors: a review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. Veterinary Pathology. 51: 127-145.
- Ruiz, F.S., Alessi, A.C., Chagas, C.A. et al. 2005. Immunohistochemistry in diagnostic veterinary pathology: a critical review. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. 41: 263-270.
- Santos A. A., Lopes C. C., Ribeiro J. R. et al. J. 2013. Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. Veterinary Research. 9: 1-11.
- Schweizer J., Bowden P.E., Coulombe P.A. et al. 2006. New consensus nomenclature for mammalian keratins. The Journal of Cell Biology. 174: 169–174.
- Seltmaan K., Fritsch A. W., Kas J.A. 2013. Keratins significantly contribute to cell stiffness and impact invasive behavior. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 110: 18507-12.
- Sloothaak D.A., Sahami S., van der Zaag-Loonen H.J. et al. 2014. The prognostic value of micrometastases and isolated tumour cells in histologically negative lymph nodes of patients with colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. European journal od Surgical Oncology. 40: 263-269.
- Sabin L. H., Gospodarowick, M. K., Wittekind C. H. 2009. TNM classification of malignant tumours, 7th edn., Wiley-Blackwell, 336p.
- Sorenmo K. 2003. Canine mammary gland tumors. The Veterinary Clinics Small Animal Practice. 33: 573-96.
- Sorenmo, K., Rasotto, R., Zappulli, V. et al. 2011. Development, Anatomy, Histology, Lymphatic Drainage, Clinical Features, and Cell Differentiation Markers of Canine Mammary Gland Neoplasms. Veterinary Pathology. 48: 85-97.

- Szczubial M, Lopuszynski W. 2011. Prognostic value of regional lymph node status in canine mammary carcinoma. *Veterinary Comparative Oncology*, 9: 296-303.
- Weaver D, 2009. The prognostic importance of isolated tumor cell clusters and micrometastases in sentinel lymph nodes. *Cancer Investigation*. 27: 121-128.
- Wong S. L., Chao C., Edwards M. J. et al. 2001. The use of cytokeratin staining in sentinel lymph node biopsy for breast cancer. *American Journal of Surgery*. 182: 330-334.