

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**COMPARAÇÃO ENTRE OS SISTEMAS DE CLASSIFICAÇÃO  
CITOPATOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA PARA AS NEOPLASIAS  
MAMÁRIAS MALIGNAS EM CADELAS**

Adriana Pereira Furtado

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Batista Brito

GOIÂNIA

2016



**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1**                    **1. Identificação do material bibliográfico:**            ☒ **Dissertação**            ☐ **Tese**

**1**                    **2. Identificação da Tese ou Dissertação**

**2**

Nome completo do autor: **Adriana Pereira Furtado**

Título do trabalho: **COMPARAÇÃO ENTRE OS SISTEMAS DE CLASSIFICAÇÃO CITOPATOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA PARA AS NEOPLASIAS MAMÁRIAS MALIGNAS EM CADELAS**

**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento ☒ **SIM**            ☐ **NÃO<sup>1</sup>**

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do (s) arquivo (s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

\_\_\_\_\_*Adriana P. Furtado*\_\_\_\_\_

Data: 08 / 12 / 2016

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

<sup>2</sup>A assinatura deve ser ~~escaneada~~.

ADRIANA PEREIRA FURTADO

**COMPARAÇÃO ENTRE OS SISTEMAS DE CLASSIFICAÇÃO  
CITOPATOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA PARA AS NEOPLASIAS  
MAMÁRIAS MALIGNAS EM CADELAS**

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás para obtenção do título de Mestre.

**Área de Concentração:**

Patologia, Clínica e Cirurgia Animal

**Linha de pesquisa:**

Patologia animal, experimental e comparada

**Orientador:**

Prof. Dr. Luiz Augusto Batista Brito - EVZ/UFG

**Comitê de orientação:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Ana Paula Iglesias Santin - EVZ/UFG

Prof. Dr. Luiz Augusto de Souza – EVZ/UFG

GOIÂNIA

2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do  
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Furtado, Adriana Pereira  
COMPARAÇÃO ENTRE OS SISTEMAS DE CLASSIFICAÇÃO  
CITOPATOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA PARA AS NEOPLASIAS  
MAMÁRIAS MALIGNAS EM CADELAS [manuscrito] / Adriana Pereira  
Furtado. - 2016.  
XI, 51 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Batista Brito; co-orientadora  
Dra. Ana Paula Iglesias Santin; co-orientador Dr. Luiz Augusto de  
Souza.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola  
de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal, Goiânia, 2016.

Bibliografia.

Inclui fotografias, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. CÃES. 2. CITOLOGIA. 3. DRENAGEM LINFÁTICA. 4.  
METÁSTASES. 5. TUMORES MAMÁRIOS. I. Brito, Luiz Augusto  
Batista, orient. II. Título.

CDU 639.09

1 ATA NÚMERO **455** DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DO PROGRAMA DE  
2 PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
3 DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS. Às **14h00min** do dia **30/09/2016**, reuniu-se na sala  
4 de defesas do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, a Comissão Julgadora infra  
5 nomeada para proceder ao julgamento da Defesa de Dissertação de Mestrado apresentado (a) pelo  
6 (a) Pós-Graduando (a) **Adriana Pereira Furtado**, intitulada: "*Linfonodos sentinelas envolvidos*  
7 *no prognóstico de neoplasias mamárias em cadelas*", apresentado para obtenção do Título de  
8 Mestre em Ciência Animal, junto à Área de Concentração: **Patologia, Clínica e Cirurgia Animal**,  
9 desta Universidade. O Presidente da Comissão Julgadora, **Prof. Dr. Luiz Augusto Batista Brito**,  
10 iniciando os trabalhos, concedeu a palavra ao (a) candidato (a) **Adriana Pereira Furtado** para  
11 exposição em **quarenta** minutos do seu trabalho. A seguir, o senhor Presidente concedeu a palavra,  
12 pela ordem sucessivamente, aos Examinadores, os quais passaram a arguir o (a) candidato (a),  
13 durante o prazo máximo de **vinte** minutos, assegurando-se ao mesmo igual prazo para responder  
14 aos Senhores Examinadores. Ultimada a arguição, que se desenvolveu nos termos regimentais, a  
15 Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o (a) candidato (a)  
16 **Aprovado (a) ou Reprovado (a):**  
17 Prof. Dr. Luiz Augusto Batista Brito (Orientador (a)) Aprovada  
18 Profa. Dra. Júlia de Miranda Moraes Aprovada  
19 Profa. Dra. Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura Aprovada  
20 Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o(a) candidato(a) **Adriana Pereira**  
21 **Furtado**, habilitada **[(Habilitado(a) ou não Habilitado(a)]** pelo(s)  
22 motivo(s) abaixo exposto(s):

23 \_\_\_\_\_  
24 \_\_\_\_\_  
25 \_\_\_\_\_  
26 \_\_\_\_\_  
27 \_\_\_\_\_  
28 \_\_\_\_\_  
29 \_\_\_\_\_  
30 \_\_\_\_\_  
31 \_\_\_\_\_  
32 \_\_\_\_\_  
33 \_\_\_\_\_



ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



34 A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da dissertação:

35 *Comparação entre os sistemas de classificação*  
36 *citopatológica e histopatológica para as*  
37 *neoplasias mamárias malignas em cadelas*  
38  
39  
40

41 Nada mais havendo a tratar, eu **Prof. Dr. Luiz Augusto Batista Brito** lavrei a presente ata que,  
42 após lida e achada conforme foi por todos assinada.

43 Prof. Dr. Luiz Augusto Batista Brito

44 Profa. Dra. Júlia de Miranda Moraes

45 Profa. Dra. Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura

Dedico este trabalho a Deus,  
pelas bênçãos diariamente concedidas.  
À minha família, pelo apoio  
incondicional oferecido.  
Ao meu marido, por estar sempre ao  
meu lado.  
Aos pacientes, motivo de todo  
o trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo milagre da vida, pelas bênçãos imensuráveis que recebo dia após dia. Pela proteção e pelo amor incondicional.

Agradeço à minha família. Minha mãe Ivonete Aparecida Pereira, meu pai Sérgio Furtado de Lima e irmã Andressa Pereira Furtado, as pessoas mais importantes da minha vida, sem as quais não poderia ter chegado aqui. Essa vitória e todas as outras da minha vida nunca teriam acontecido sem vocês. Agradeço a todos os familiares, que torceram por mim e sempre me incentivaram a seguir adiante.

Ao meu marido Gustavo Henrique Coutinho, a melhor pessoa do mundo, que me apoiou em todos os momentos desta caminhada. Em quem me inspiro a continuar buscando meus objetivos e ser melhor a cada dia. Aos amigos, os antigos e os novos, todos que de algum modo contribuíram para meu sucesso.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Augusto Batista Brito, pelo acolhimento como sua orientada, pela riqueza de vocabulário que muitas vezes me faltou e por todo seu empenho em ajudar. À minha coorientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Ana Paula Iglesias Santin, pelos conselhos, pelo conforto quando me senti desesperada, pela prontidão, pelas ideias e principalmente pelo desprendimento e amor em ensinar.

Aos colegas médicos veterinários da Clínica Pegasus que trabalharam muito em prol desse projeto e desprendidamente me encaminharam inúmeros pacientes para este trabalho.

Ao Setor de Patologia Animal EVZ – UFG e a todos seus membros, professores, técnicos, residentes, alunos de graduação e pós-graduação, que estiveram comigo durante todas as etapas do mestrado, sempre dispostos a ajudar, seja imprimindo papéis ou auxiliando nas etapas do experimento. Minha eterna gratidão a cada um!

À Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, por me proporcionarem uma formação de qualidade, tanto como profissional, quanto como ser humano. Ao CNPq pela bolsa concedida.

À Banca Examinadora, por gentilmente aceitarem o convite de avaliação deste trabalho.

A todos que contribuíram e acreditaram neste projeto, meus sinceros agradecimentos.



“Porque aqueles que são loucos o suficiente para achar que podem mudar o mundo, são os que mudam” (Steve Jobs)

## SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO .....	1
2.REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1. A GLÂNDULA MAMÁRIA .....	4
2.2. EPIDEMIOLOGIA .....	5
2.2.1. INCIDÊNCIA.....	5
2.2.2. SEXO.....	7
2.2.3. IDADE .....	7
2.2.4. RAÇA.....	7
2.2.5. LOCALIZAÇÃO .....	8
2.3. ETIOLOGIA.....	9
2.3.1. FATORES GENÉTICOS .....	9
2.3.2. FATORES HORMONAIS .....	10
2.4. DIAGNÓSTICO .....	12
2.4.1. DIAGNÓSTICO CLÍNICO .....	12
2.4.2. DIAGNÓSTICO CITOPATOLÓGICO .....	13
2.4.3. DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO .....	14
2.4.4. GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA.....	18
3.OBJETIVOS E METAS .....	20
3.1. OBJETIVO GERAL.....	20
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20

3.3. METAS .....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	21
5. RESULTADOS .....	25
5.1. ANAMNESE E ASPECTOS CLÍNICOS .....	25
5.2. IDENTIFICAÇÃO DO LINFONODO COM AZUL DE METILENO .....	26
5.3. RESULTADOS DOS EXAMES CITOLÓGICOS .....	27
5.4. DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO .....	29
5.5. EXAME CITOLÓGICO X EXAME HISTOPATOLÓGICO .....	34
5.6. METÁSTASES .....	35
6. DISCUSSÃO .....	34
7. CONCLUSÕES .....	43
REFERÊNCIAS .....	44

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Cadela posicionada em decúbito dorsal para realização de mastectomia bilateral total. (A) Observa-se a presença de nódulos em mama inguinal esquerda, mama torácica esquerda e mama torácica direita. Nota-se ainda marcação de coloração azul, da via linfática, indicando a drenagem do nódulo tumoral até o linfonodo sentinela. (B) Procedimento cirúrgico, após incisão das camadas epitelial e subcutânea, observando-se a marcação dos vasos linfáticos pelo corante, sem impregnação dos tecidos adjacentes, possibilitando a identificação do linfonodo sentinela. ....26
- Figura 2. Fotomicrografia da citologia de glândula mamária, em cadela com carcinoma mamário. Observa-se agregados de células epiteliais de aspecto neoplásico, com acentuados pleomorfismo, anisocitose e anisocariose. Giemsa, 40x. (Fonte: SPA/EVZ/UFG) .....27
- Figura 3. Fotomicrografia da citologia de glândula mamária, em cadela com tumor misto benigno. Observa-se células epiteliais e mioepiteliais bem diferenciadas apresentando discreta anisocitose e anisocariose. Giemsa, 10x. (Fonte: SPA/EVZ/UFG) .....28
- Figura 4. Fotomicrografia de Carcinoma túbulo-papilar, com proliferação de células epiteliais de aspecto neoplásico, acompanhada por fina sustentação de estroma, apresentando arranjo túbulo-papilar. HE, 10x .....29
- Figura 5: Fotomicrografia de Carcinoma Sólido de glândula mamária, em cadela. Verificando-se intensa proliferação de células epiteliais com distribuição e aspecto sólido, células neoplásicas com acentuado pleomorfismo, anisocitose, anisocariose, elevada relação núcleo citoplasma e com um ou mais nucléolos evidentes (cabeça de seta). Além de figuras de mitose (setas). HE. 40x. ....30

- Figura 6. Fotomicrografia de tecido mamário, de uma cadela, SRD, apresentando proliferação de células epiteliais intraductais, que se apresentam em aglomerados, separadas por espaços lacunares vazios. Não há estroma evidente. HE 40X.  
.....31
- Figura 7. Fotomicrografia de Carcinoma Complexo verificando-se a proliferação de células epiteliais (estrelas vermelhas) apresentando moderado pleomorfismo, anisocitose e anicariose, relação núcleo citoplasma elevada e baixo índice mitótico. As células mioepiteliais apesar de estarem proliferadas, são bem diferenciadas, com aspecto semelhante aqueles observados no tecido normal (estrelas pretas). HE. 40x.  
.....32
- Figura 8. Fotomicrografia de Carcinossarcoma de glândula mamária, em cadela, observando-se características de malignidade tanto nas células epiteliais como no tecido cartilaginoso, oriundo de diferenciação mesenquimal (estrelas). HE. 10x. ....33

**LISTA DE QUADROS**

- Quadro 1. Diagnóstico histopatológico e tamanho de tumores mamários de 43 cadelas submetidas a mastectomia no período de julho de 2014 a agosto de 2015, Goiânia, Goiás.  
.....24
- Quadro 2. Diagnóstico histopatológico e evolução clínica de tumores mamários de 43 cadelas submetidas a mastectomia no período de julho de 2014 a agosto de 2015, Goiânia, Goiás.  
.....25
- Quadro 3. Diagnóstico e gradação histológica de tumores mamários de 39 cadelas submetidas a mastectomia no período de julho de 2014 a agosto de 2015, Goiânia, Goiás.  
.....27



## RESUMO

Atualmente há uma grande casuística de neoplasias relacionadas à espécie canina, sendo as mamárias as de maior incidência nas cadelas. Embora o exame histopatológico seja recomendado como diagnóstico definitivo, a citopatologia tem demonstrado bons níveis de concordância cito-histopatológica. O estudo em tela teve finalidade de verificar a acurácia do exame citopatológico no diagnóstico de neoplasias mamárias em cadelas, cujo método implica em procedimento mais seguro, pouco invasivo e de rápido resultado. Foi realizado no Setor de Patologia Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás e em uma clínica veterinária da cidade de Goiânia, Goiás. Analisou-se o diagnóstico citopatológico e histopatológico de 43 cadelas com neoplasias mamárias malignas. Os exames citológicos foram realizados aplicando-se o método de punção aspirativa por agulha fina e os resultados foram analisados usando o diagnóstico histopatológico como confirmatório. A classificação histopatológica utilizada foi a recomendada pela Organização Mundial da Saúde para tumores mamários caninos e atualizada por Goldschmidt em 2001. Este estudo revelou uma acurácia de mais de 90% do exame citopatológico. A neoplasia mamária maligna mais frequente diagnosticada na histopatologia foi o carcinoma complexo (22%). Foi avaliada a eficácia do corante Azul de Metileno a 1% na marcação do Linfonodo Sentinela durante o procedimento de mastectomia, e este se mostrou excelente para tal marcação. Quanto aos focos de metástases regionais ou distantes, viu-se que tumores considerados mais malignos como o carcinoma anaplásico e o carcinoma micropapilares formaram mais metástases que os demais tipos histológicos.

**PALAVRAS-CHAVE:** cães, citologia, drenagem linfática, metástase, tumores mamários.

## ABSTRACT

There are currently a large number of canine related cancers, with mammary tumors having the highest incidence in bitches. Although histopathological examination is recommended as a definitive diagnosis, cytopathology has shown good levels of cyto-histopathological concordance. The screen study had the purpose of verifying the accuracy of cytopathological examination in the diagnosis of breast neoplasms in bitches, whose method implies a safer, less invasive procedure and a fast result. It was carried out in the Animal Pathology Sector of the Veterinary and Zootechnical School of the Federal University of Goiás and in a veterinary clinic in the city of Goiânia, Goiás. The cytopathological and histopathological diagnosis of 43 bitches with malignant mammary neoplasias was analyzed. The cytological exams were performed by applying the fine needle aspiration method and the results were analyzed using the histopathological diagnosis as confirmatory. The histopathological classification used was that recommended by the World Health Organization for canine mammary tumors and updated by Goldschmidt in 2001. This study revealed an accuracy of more than 90% of the cytopathological examination. The most frequent malignant mammary neoplasia diagnosed in the histopathology was the complex carcinoma (22%). The efficacy of 1% Methylene Blue dye on Sentinel Lymph node marking was assessed during the mastectomy procedure, and this was shown to be excellent for such labeling. Regarding foci of regional or distant metastases, it was found that tumors considered more malignant such as anaplastic carcinoma and micropapillary carcinoma formed more metastases than the other histological types.

**KEYWORDS:** dogs, cytology, lymphatic drainage, metastasis, mammary tumors.

## 1. INTRODUÇÃO

Há séculos, desde sua domesticação, os cães vem sendo utilizados como animais de companhia. A literatura disponível apresenta um vasto elenco de benefícios, tanto físicos como psicológicos que os cães proporcionam ao homem<sup>1</sup>. Segundo dados apresentados pela Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (Abinpet) o Brasil é o quarto país em número total de animais de estimação, sendo também o terceiro país com maior faturamento no mercado mundial. E como todo mercado em expansão, há o acréscimo de investidores, fato que ocorreu justamente em decorrência da valorização da afetividade entre o homem e o animal, acarretando em maiores gastos para proporcionar bem-estar, melhor qualidade e maior expectativa de vida para este animal, que hoje tornou-se um membro efetivo da família.

Estes dados reforçam a ideia de que cada vez mais os animais de estimação têm sido vistos como entes queridos, sendo tratados muitas vezes como um filho, revelando, desta forma, o enorme apego emocional com os cães <sup>2</sup>. Essa intimidade é apontada como uma das causas do aumento da expectativa de vida destes animais. Esta longevidade tem ocasionado o aparecimento de doenças relacionadas à idade, sendo o câncer uma das principais enfermidades observadas, e as neoplasias mamárias, uma das mais frequentes em fêmeas.

No Brasil, o câncer de mama é uma das principais causas de óbitos em mulheres constituindo-se em um importante problema de saúde pública <sup>3</sup>. O grande número de pesquisas recentes em medicina veterinária, desenvolvidas nesta área, é um reflexo da preocupação de oncologistas e patologistas sobre o tema <sup>4,5</sup>. Nos últimos anos os tumores mamários em cães têm atraído bastante os pesquisadores, uma vez que podem ser utilizados como modelos para o estudo da biologia do câncer, assim como para testes de agentes terapêuticos, devido as suas similaridades morfológicas e biológicas com as neoplasias mamárias que acometem as mulheres <sup>6</sup>.

Similar aos humanos, os cães desenvolvem tumores de mama de forma espontânea, com carcinogênese e progressão tumoral acelerada <sup>7</sup>. Este perfil biológico permite que o cão seja um modelo experimental adequado para o estudo de tumores mamários <sup>4,8</sup>. Outros

aspectos como a elevada incidência de tumores malignos e a disseminação de metástases para o pulmão, fígado e outros órgãos permitem um estudo comparativo importante. Além disso o período de exposição aos hormônios sexuais endógenos e exógenos, parecem influenciar tanto a mulher quanto a espécie canina <sup>4,8-10</sup>. Outra característica a ser evidenciada é a anatomia da glândula mamária canina por apresentar grande semelhança com a glândula mamária da mulher possibilitando associação entre o desenvolvimento tumoral e perspectivas terapêuticas entre as duas espécies, com benefícios para ambas <sup>4,7</sup>.

Um dos principais procedimentos diagnósticos tem sido a biopsia, sendo possível se estabelecer a classificação tumoral com segurança, mas o exame citológico vem conquistando cada vez mais adeptos na medicina veterinária. Em mulheres com tumores mamários a citologia aspirativa é utilizada para determinação da malignidade, sendo uma alternativa rápida, minimamente invasiva e de baixo custo, além de apresentar alta sensibilidade e especificidade <sup>11,12</sup>.

Na espécie canina, os tumores mamários são diagnosticados com frequência representando aproximadamente 52% de todas as neoplasias que afetam as fêmeas desta espécie, sendo que em 50% destas, revelam-se malignas.<sup>13</sup>, Nestes casos, quase a metade dos animais afetados vem a óbito no primeiro ano após o diagnóstico em decorrência do estado avançado da doença ou de recidivas locais, acompanhadas pelo surgimento de metástases nos linfonodos regionais ou em órgãos distantes <sup>14-16</sup>.

O sistema linfático desempenha papel importante, tanto no controle local do tumor como no mecanismo de transporte celular <sup>15,17</sup>. A formação de novos vasos linfáticos ocorre desde o início do desenvolvimento tumoral, podendo ocasionar na formação de um padrão vascular diferente do observado em animais hígidos <sup>17,18</sup>. As metástases não são aleatórias, sendo determinadas pelo fluxo preferencial para o primeiro linfonodo da cadeia linfática a receber a drenagem do tumor, denominado Linfonodo Sentinela (LS), correspondendo ao local inicial de metástase, disseminando-se via linfática, para outros linfonodos. <sup>19-21</sup>.

Uma boa coleta de dados durante a anamnese, uma avaliação clínica criteriosa, exames de imagem, análises histopatológica e citologia por punção aspirativa são ferramentas eficientes para compreensão do comportamento biológico da neoplasia e a obtenção de um diagnóstico precoce dos tumores e metástases, além de fornecer

informação prognóstica fundamental para determinação do protocolo de tratamento mais adequado para o paciente<sup>22-26</sup>.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A Glândula Mamária

As glândulas mamárias correspondem ao produto de glândulas sudoríparas modificadas<sup>27</sup>. A cadela possui cinco pares de glândulas mamárias, denominadas torácicas craniais, torácicas caudais, abdominais craniais, abdominais caudais e inguinais, embora que, excepcionalmente, possa apresentar apenas quatro pares<sup>28</sup>.

Estruturalmente, as glândulas mamárias são formadas por lóbulos túbulo-alveolares, separados por septos conjuntivos, cujos ductos drenam para canais excretores mais calibrosos, os ductos lactíferos que se abrem no teto, em número variável. O epitélio de revestimento dos ductos é duplo, onde as células podem ser cúbicas ou cilíndricas. Os alvéolos das glândulas mamárias também são compostos por epitélios luminal e células mioepiteliais. As células epiteliais luminais sintetizam e excretam proteínas lácteas e lipídeos, durante a lactação, e as células mioepiteliais contraem-se, sob a influência da ocitocina, expelindo assim o leite. Além do tecido epitelial, ainda há a presença de fibroblastos e células adiposas que compõem e fazem a sustentação do tecido mamário<sup>29</sup>.

A circulação linfática promove o contato de glândulas homolaterais, mas não existe contato direto entre as cadeias direita e esquerda. Todas as glândulas têm drenagem independente para o linfonodo mais próximo. No entanto, as glândulas abdominais craniais são as únicas que drenam simultaneamente para o linfonodo axilar acessório e para os linfonodos inguinais superficiais. Desta forma, as comunicações mais comuns são entre as glândulas torácica cranial e torácica caudal, ambas drenadas pelo gânglio linfático axilar e, entre as glândulas abdominal caudal e inguinal, drenadas pelo gânglio linfático inguinal superficial. A glândula mamária abdominal cranial é drenada pelo gânglio linfático axilar, mas é frequentemente drenada, simultaneamente, pelo gânglio linfático inguinal superficial<sup>15,17,27,30</sup>.

Antes da puberdade, a mama cresce na mesma velocidade que o indivíduo, caracterizando um crescimento isométrico. Nesta fase, a glândula mamária é composta principalmente por tecido adiposo e uma limitada rede de ductos<sup>27</sup>. Com o início da puberdade, ocorre a ação dos hormônios esteroides sexuais, seguindo-se uma fase de



crescimento dos canais mamários e do estroma ou crescimento alométrico<sup>31</sup>. Devido ao efeito do estrógeno, o sistema tubular desenvolve-se, durante a puberdade, com discreto aumento de células adiposas. Já a progesterona, promove o desenvolvimento glandular, com proliferação das células epiteliais da porção terminal dos ductos intralobulares. Subsequentemente, ocorre a formação dos alvéolos secretores. Como o ciclo estral da espécie canina é caracterizado por uma fase progesterônica longa, que dura de sessenta a cem dias após o início do estro, o hormônio em questão tem um papel crucial sobre as glândulas mamárias da cadela<sup>32</sup>.

Em animais gestantes ou não-gestantes, os lóbulos passam a substituir o tecido adiposo e o desenvolvimento lóbulo-alveolar é acompanhado por uma pequena atividade secretória. A estrutura canalicular passa a representar 90% do tecido ao final da gestação, em contraste com os 10% que representava no início da gestação<sup>32</sup>. Na iminência do parto, verifica-se secreção láctea acumulada no lúmen dos alvéolos e há diminuição substancial do estroma conjuntivo. Durante a lactação, os ductos e alvéolos apresentam-se distendidos, uns mais do que os outros<sup>28</sup>.

A involução das glândulas após a amamentação nunca é completa, uma vez que os alvéolos não desaparecem totalmente. O aspecto histológico é aquele de um colapso alveolar com desorganização celular. Dessa forma, todas as modificações organizacionais do tecido glandular mamário, apesar de fisiológicas, podem ensejar alterações neoplásicas diversas, que ocorrem especialmente na região epitelial<sup>28</sup>.

Visto que nos carnívoros não existe o equivalente à menopausa, a glândula mamária está sob influência hormonal até idades muito avançadas<sup>33</sup>.

## **2.2. Epidemiologia**

### **2.2.1. Incidência**

As neoplasias mais frequentes na espécie canina são as de pele, seguidas das neoplasias da glândula mamária<sup>7</sup>. Contudo, os tumores de mama são os mais frequentes na cadela, representando cerca de 52% dos processos tumorais, sendo que destes 41 a 53%

correspondem a tumores malignos<sup>14-16</sup>. Comparando com a espécie humana, a incidência de tumores na cadela é aproximadamente três vezes maior<sup>34</sup>.

A exposição a hormônios ovarianos endógenos no início da vida é a causa mais importante de desenvolvimento do tumor mamário em cães, já que esses tumores são hormônio-dependentes<sup>35,36</sup>. Schneider et al.<sup>37</sup> afirmaram que o risco de desenvolvimento da neoplasia mamária aumenta drasticamente durante os primeiros ciclos estrais, podendo ser confirmado pelo fato de que uma cadela quando submetida a ovário-histerectomia antes do primeiro estro tem um risco, de apenas, 0,5% de desenvolver tumores mamários, em comparação com cadelas submetidas à castração entre o primeiro e segundo estro ou depois do segundo estro, que passam a apresentar um risco de 8% e 26%, respectivamente. No entanto, a prevenção das neoplasias mamárias por meio da ovário-histerectomia após o segundo cio ainda é contraditória<sup>37-40</sup>.

Autores relatam o envolvimento da hipófise no desenvolvimento do tumor de mama canino, pois foi observada a elevação de prolactina sérica em cães portadores dessa neoplasia<sup>41-43</sup>. A prolactina é necessária para manutenção da atividade secretória, apesar de não atuar diretamente sobre a proliferação celular mamária. É sabido que ela estimula o crescimento do tumor pela sensibilização celular aos efeitos do estrógeno, promovendo aumento no número de receptores para esse hormônio, ou seja, tanto o estrógeno quanto a prolactina são necessários ao crescimento tumoral nas glândulas mamárias<sup>41</sup>.

Outras variáveis reprodutivas, como irregularidade no estro, pseudociese e prenhes podem resultar em mudanças fisiológicas nos níveis hormonais endógenos, mas ainda não foram encontrados indícios que confirmem a influência significativa no risco de tumor mamário em cães<sup>37-39</sup>. Porém, a exposição a doses farmacológicas de hormônios exógenos, progesterona e estrógenos, com a finalidade de atrasar ou impedir o estro tm sido associadas ao aumento do risco destas neoplasias<sup>36</sup>. Estes resultados são baseados em um corpo significativo de evidências de pesquisas desenvolvidas em cães tratados a longo prazo com várias doses e combinações de fibras sintéticas de progesterona e estrogênios, monitorados até o desenvolvimento do tumor. Esses hormônios resultam em uma superprodução de hormônio do crescimento (GH), supressão do córtex adrenal e desenvolvimento de displasias e tumores mamários, na maioria das vezes, benignos<sup>35-37,39,40,44,45</sup>.

### **2.2.2. Sexo**

Os tumores mamários são quase exclusivos do sexo feminino. Quando surgem no cão estão geralmente associados a tumores produtores de estrogênios, como os sertoliomas<sup>34</sup>. Porém, podem surgir em animais sem tumores testiculares e que nunca foram sujeitos a tratamentos hormonais, como se observou num estudo realizado com 27 tumores mamários provenientes de 18 cães machos (três inteiros e 15 castrados). Todos os tumores eram benignos sendo 26 adenomas simples e um adenoma complexo<sup>46</sup>.

Um estudo retrospectivo verificou que a cadela tem 72 vezes mais probabilidade de desenvolver tumores mamários do que o macho<sup>47</sup> e, concluiu que as neoplasias mamárias no cão são raras e geralmente benignas, tendo sido observado apenas um animal com tumor maligno, entre os oito estudados<sup>47</sup>.

### **2.2.3. Idade**

A idade é um dos fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento de tumores mamários em cães <sup>36,48</sup>. O risco começa a tornar-se significativo em torno dos oito anos de idade e aumenta linearmente com o avanço desta. A maioria dos autores relata que na faixa etária entre oito e onze anos existe uma incidência maior de tumores malignos, enquanto cães mais jovens são mais propensos a apresentarem tumores benignos <sup>36,44,45,48</sup>.

### **2.2.4. Raça**

Um estudo com 101 tumores, sendo sessenta animais de raças pequenas e quarenta de raças grandes, verificou que 25% das cadelas de raça pequena apresentavam neoplasias malignas, contrastando com 58% de raças grandes. Este estudo sugere que a incidência de tumores malignos é maior em raças grandes<sup>49</sup>. No entanto, não tem sido possível estabelecer uma predisposição racial para as neoplasias mamárias. Alguns autores apontam para uma maior incidência no Poodle, Cocker Spaniel inglês, Setter inglês,

Pointer, Fox Terrier e Terrier de Boston<sup>50</sup>. Outros autores, além das raças já referidas, encontraram frequências elevadas em Samoiedas, Pastor dos Pirinéus, Labrador Retriever e Dachshund<sup>5</sup>.

Contrariamente ao que se verifica com as neoplasias em geral, a raça Boxer parece não ser tão susceptível aos tumores da mama., contudo nesta raça, surgem numa idade mais precoce, comparativamente com às outras<sup>51</sup>. A raça Beagle também foi referida como apresentando menor risco de desenvolver tumores da mama <sup>42</sup>.

Conclui-se, portanto, que os pesquisadores ainda não chegaram a um consenso, observam-se mudanças constantes, de acordo com a parte do mundo onde o estudo foi realizado <sup>35,37,38,44,52</sup>.

#### **2.2.5. Localização**

Os tumores podem estar associados ao mamilo ou com mais frequência, ao tecido glandular. A frequência de tumores na espécie canina aumenta no sentido cranial, ou seja das glândulas mamárias caudais para as craniais<sup>34</sup>.

Shafiee et al. <sup>6</sup> relataram que a localização preferencial de neoplasias mamárias em cadelas são as das mamas inguinais (60% dos casos), seguidas dos pares abdominais (27%), e por último, os lobos torácicos (13%). A grande frequência de tumores no lobo inguinal, provavelmente decorre do maior volume de tecido mamário nestes pares. Estes pesquisadores ainda notaram que na grande maioria dos casos as massas tumorais foram encontradas na cadeia mamária esquerda, enquanto apenas 33% das massas estavam localizadas na cadeia direita.

É frequente haver mais de uma glândula afetada e por vezes toda a cadeia do mesmo lado. É ainda possível encontrar mais de uma massa tumoral na mesma glândula, sendo as neoplasias consideradas multicêntricas<sup>51</sup>.

## **2.3. Etiologia**

### **2.3.1. Fatores Genéticos**

A maioria dos tumores surge por mutação ou ativação anormal dos genes que controlam o crescimento das células, resultando em modificações progressivas da biologia celular. Estas modificações são caracterizadas por alterações na proliferação, diferenciação e na interação das células com o meio extracelular. Os principais alvos das alterações genéticas são os proto-oncogenes, os genes supressores tumorais e os genes que controlam a apoptose. Acredita-se que os genes responsáveis pela reparação do DNA também desempenham um papel importante na carcinogênese, uma vez que qualquer alteração nestes genes predisporia a alterações no genoma e a subsequente transformação neoplásica<sup>53</sup>.

Os proto-oncogenes são genes promotores do crescimento e da diferenciação celular que controlam a divisão mitótica. Podem ser transformados em oncogenes pelo descontrole da expressão genética, ou pela mutação, translocação ou rearranjo dos genes, resultando na síntese de oncoproteínas. Os oncogenes e os seus produtos podem aumentar a expressão dos genes das ciclinas e das quinases ciclina-dependentes (CDK) responsáveis pela progressão ordenada das células nas diferentes fases do ciclo celular. As mutações nestas proteínas favorecem a proliferação celular descontrolada<sup>53</sup>. A expressão do oncogene HER-2, responsável pela codificação de receptores para fatores de crescimento, surge aumentada em tumores malignos da espécie, não tendo sido observada em tumores benignos<sup>54</sup>.

O grupo dos genes supressores tumorais engloba os que regulam a transcrição nuclear e o ciclo celular (Rb, p53, BRCA-1, BRCA-2), os que regulam a transdução de sinais (NF-1, APC) e os receptores de superfície celular (receptores do TGF- $\beta$  e caderinas)<sup>53</sup>. O gene p53 é um dos agentes supressores e inibidores de crescimento melhor caracterizados<sup>54</sup>. Produz uma proteína que controla a replicação do DNA, a proliferação celular e a apoptose<sup>53</sup>. Um estudo verificou a presença de uma mutação neste gene em 17%

dos 69 carcinomas mamários caninos analisados, estando este fato associado ao aumento do risco de recidivas<sup>55</sup>.

Os genes BRCA desempenham um papel importante na preservação da estabilidade genômica, atuando na indução de genes reparadores de DNA. Apesar da mutação nestes genes influenciar o prognóstico dos tumores da mama na mulher, nenhum dos estudos realizados em cadelas revelou qualquer associação entre o pleomorfismo genômico do BRCA-1 e BRCA-2 e o desenvolvimento ou presença de tumores mamários caninos<sup>54</sup>.

Vários tipos de moléculas expressas na superfície das células controlam o crescimento e comportamento celular, tais como os receptores do TGF- $\beta$  que entre outras funções regulam a adesão celular por parte das caderinas. Foi demonstrada a correlação positiva entre a agressividade do tumor e a mutação nos genes CDH1, que codifica as caderinas<sup>53</sup>. Os genes que impedem (Bcl 2, Bcl-XL) ou que induzem (Bax, Bad) a apoptose desempenham um importante papel na carcinogênese. A morte celular induzida pelo Bcl 2 pode ocorrer em qualquer fase do ciclo celular, desta forma, uma alteração ocorrida neste gene aumentará o tempo de sobrevivência das células favorecendo a ação de oncogenes sobre estas<sup>53</sup>.

Níveis anormais de expressão dos genes mediadores de apoptose, de genes reparadores do DNA, de proto-oncogenes e de genes supressores tumorais entre outros, estão claramente envolvidos na gênese tumoral da mama<sup>54</sup>.

### **2.3.2. Fatores Hormonais**

Os fatores hormonais são os mais amplamente estudados e têm um papel fundamental na carcinogênese mamária na cadela<sup>8</sup>. Sabe-se que o desenvolvimento destes tumores na cadela é hormônio-dependente e como tal verificam-se diferenças significativas entre cadelas castradas e não castradas, relativamente ao risco de ocorrência de tumores mamários<sup>35,40</sup>. As fêmeas ovariectomizadas antes das primeiras manifestações de cio apresentam um risco mínimo, comparativamente às que são esterilizadas depois do segundo ciclo estral<sup>37</sup>.



A progesterona, os estrógenos, os andrógenos, a prolactina (PRL) e o hormônio do crescimento (GH) são os hormônios que estão envolvidos, com maior frequência, no desenvolvimento tumoral<sup>33</sup>. Assim como ocorre na mulher, a glândula mamária normal da cadela apresenta receptores de estrogénios (ERs) e de progesterona (PRs). Estes receptores são encontrados tanto na mama normal, como em neoplasias benignas e malignas<sup>33</sup>. Misdorp<sup>36</sup> relata que cerca de 40 a 60% dos tumores benignos e malignos apresentam positividade para ERs, PRs e para receptores de prolactina, bem como para receptores de andrógenos. Outro estudo verificou a presença de ERs em 100% dos tecidos mamários normais e displásicos estudados e em 95% dos tecidos benignos. Relativamente aos carcinomas analisados, apenas 62% evidenciaram a presença destes receptores<sup>33</sup>.

Outro estudo analisou sete casos de metástases ganglionares, sendo o tumor primário e o gânglio linfático testados para a presença de ERs e PRs. Ambos foram considerados negativos, o que sugere perda de dependência hormonal por parte dos tumores malignos<sup>43,56</sup>. A proporção de tumores benignos positivos para ERs e PRs é elevada, no entanto, no que se refere aos tumores malignos, apenas uma parte apresenta estes receptores e em menor concentração<sup>57</sup>. Este fato verifica-se particularmente nas neoplasias de maior grau de malignidade ou nas fases mais avançadas da doença. Desta forma, os carcinomas com menor grau de diferenciação apresentam um menor número de receptores. Observou-se também que carcinomas complexos, com melhor prognóstico, possuem mais receptores hormonais dos que os carcinomas simples<sup>33,41,58</sup>.

O envolvimento da glândula hipofisária na gênese tumoral também tem sido alvo de estudos, visto que esta controla a secreção de PRL e da GH, necessárias ao desenvolvimento e funcionamento normais, da glândula mamária. A PRL está envolvida na atividade secretória, não tendo influência direta na proliferação celular da glândula mamária, no entanto facilita a ação mitótica influenciada pelo estrógeno, promovendo o aumento do número de ER.<sup>33,41,58</sup> Foram detectados níveis sanguíneos e teciduais de PRL significativamente elevados em cadelas com neoplasias malignas, comparativamente ao de glândulas mamárias normais<sup>57</sup>. Sugere-se, portanto, que os desequilíbrios entre as concentrações de PRL e de GH estariam implicados na gênese tumoral<sup>33,36,41,57,58</sup>.

Os progestágenos sintéticos usados para inibição do estro na cadela têm sido alvo de alguns estudos, de forma a avaliar a sua possível relação com o desenvolvimento

de tumores mamários<sup>42</sup>. Verificou-se que o uso prolongado de progestinas aumenta o risco de desenvolvimento de tumores benignos na cadela, enquanto, tratamentos combinados de progestinas e estrógenos ou altas doses de progesterona estão relacionado com o aparecimento de tumores malignos<sup>42</sup>.

A progesterona exógena estimula a síntese de GH por parte da glândula mamária canina com proliferação lóbulo-alveolar e consequente hiperplasia dos elementos mioepiteliais e secretórios, induzindo assim a formação de lesões benignas, ao passo que o estrogênio estimula o crescimento ductal<sup>42,43,59</sup>. Não está totalmente esclarecido se a GH induzida pelos progestágenos tem algum efeito no desenvolvimento tumoral da mama. Contudo, paralelamente à produção de GH, verificou-se o aumento dos níveis sanguíneos de fator I de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) e fator II de crescimento semelhante à insulina (IGF-II), capazes de estimular a proliferação celular da glândula mamária<sup>42,43,59</sup>.

## **2.4. Diagnóstico**

### **2.4.1. Diagnóstico Clínico**

O atendimento clínico tem como base a obtenção de um histórico completo, incluindo informação acerca do sexo, raça e idade do animal, bem como a data de início das lesões, tamanho, número e velocidade de crescimento das massas<sup>60</sup>. É também importante observar a localização e consistência das lesões, presença ou ausência de ulceração e fixação ou não à pele e tecidos adjacentes<sup>5</sup>. As manifestações de prurido e a eliminação de secreção são informações dignas de registo, bem como os dados relativos ao estado reprodutivo do animal, tais como castração, regularidade dosaios, existência de pseudo-gestação, ocorrência de partos e lactações e a administração de progestágenos<sup>60</sup>.

Seguidamente deve-se proceder a realização de um exame físico minucioso com palpação de todas as glândulas mamárias e linfonodos regionais. Embora, em alguns casos, a palpação da glândula mamária não permita a detecção de nódulos inferiores a 0,5 cm de diâmetro. Os mamilos devem ser comprimidos para avaliar a presença de secreção<sup>60</sup>. É recomendada a realização sistemática de radiografias torácicas e ultrassonografias

abdominais para pesquisas de metástases. Porém, um exame de imagem negativo não garante a sua inexistência, pois as metástases podem ter dimensões reduzidas (inferiores a 0,5 cm) ou estarem sobrepostas por outros órgãos ou estruturas<sup>60</sup>.

O estado geral do animal deve ser avaliado por meio de análises hematológicas, bioquímicas sanguíneas e da urinálise, fornecendo informações relativas à possibilidade de existência de síndrome paraneoplásica<sup>61</sup>. A análise clínica das neoplasias, ainda, deve conduzir à determinação do estadiamento ou fase de evolução do processo<sup>26</sup>.

#### **2.4.2. Diagnóstico Citopatológico**

A citopatologia estuda as alterações relacionadas com as células enquanto entidades integradoras de processos patológicos e tem como principal objetivo o diagnóstico diferencial entre processos inflamatórios, hiperplásicos e neoplásicos. A punção aspirativa por agulha fina (PAAF) é um método largamente utilizado na obtenção de amostras para diagnóstico citológico em vários órgãos<sup>12</sup>. Quando aplicada em lesões da glândula mamária, o método apresenta boa precisão diagnóstica, além de ser um método de baixo custo, rápido e sem grandes riscos para o paciente<sup>22,62</sup>.

Na medicina veterinária, a utilização da citologia como método de diagnóstico é crescente nos últimos vinte anos e os resultados correlacionam-se bem com o diagnóstico histopatológico de vários tipos de tumores<sup>63</sup>. A maior parte dos estudos, que analisam a acurácia do exame citopatológico, classifica as neoplasias mamárias apenas de acordo com a origem e malignidade das células<sup>6</sup>. Porém, diagnósticos citológicos satisfatórios também são dependentes da qualidade do material coletado, pois amostras com número insuficiente de células, contaminação excessiva de sangue, gota espessa, manchas ou artefatos, bem como coleta realizada de maneira errônea podem comprometer significativamente o diagnóstico ou levar a resultados inconclusivos<sup>12,22</sup>.

Os tumores mamários malignos podem ser diagnosticados com base no aspecto citológico dos tipos celulares presentes e devem ser observados mais que três características de malignidade. Dentre esses critérios estão anisocitose, anisocariose, macrocariose, vacúolos intracitoplasmáticos, basofilia e eosinofilia citoplasmáticas, célula

em fusão, célula em girino, fagocitose e projeções citoplasmáticas, bem como hipercromasia, binucleação, multinucleação, pseudoinclusão e figuras de mitose <sup>11,22,62,64</sup>.

Em geral, os carcinomas são citologicamente caracterizados pela presença de alta celularidade, grupos celulares tridimensionais, isolados ou em grupos celulares pouco coesos, anisocariose e nucléolos proeminentes <sup>65</sup>. Aspirados de tumores mamários mistos malignos podem revelar células epiteliais e fusiformes, células individualizadas de origem mesenquimal com uma destas populações exibindo características de malignidade. Comumente também são vistos elementos cartilaginosos ou ósseos. Tumores complexos malignos se diferenciam, citologicamente, de tumores mistos pela presença de células mioepiteliais que não apresentam critérios de malignidade <sup>66</sup>, sendo apenas a população epitelial maligna.

Nos casos dos carcinosarcomas, ambas as populações, epitelial e mesenquimal, devem exibir padrões de malignidade. Já os sarcomas mamários, como osteossarcoma, fibrossarcoma e lipossarcoma apresentam aspecto citológico semelhante àquele verificado em outros órgãos. O sarcoma tende a esfoliar pouco, resultando em amostras de baixa celularidade e, em geral, caracteriza-se por apresentar células irregulares a fusiformes dispostas individualmente e em pequenos aglomerados <sup>66-68</sup>.

A sensibilidade e especificidade do exame citológico para o diagnóstico de malignidade, utilizando-se a histopatologia como o método de referência são consideravelmente altas, na maioria dos estudos <sup>7,11,12,22,69</sup>. Contudo, é importante ressaltar que tanto na medicina humana, quanto na medicina veterinária, a citologia aspirativa é um exame de triagem, pois, ainda que esporadicamente, podem ocorrer resultados não compatíveis com o resultado final da biópsia. Portanto, o exame histopatológico continua sendo o mais fidedigno e adequado para diagnósticos de neoplasias mamárias <sup>11,12</sup>.

### **2.4.3. Diagnóstico Histopatológico**

A análise histopatológica é a técnica de eleição no diagnóstico, devendo ser realizado em todas as circunstâncias, pois permite o estabelecimento do prognóstico com elevada precisão<sup>60</sup>. Pode ser realizada por meio de biópsia incisional (fragmento de biópsia

cirúrgica) ou excisional (após a remoção cirúrgica do tumor)<sup>11</sup>. De modo geral, a histopatologia é realizada sobre a totalidade do tumor, visto que em medicina veterinária a excisão cirúrgica é o tratamento de eleição. Porém, a biópsia é útil para diferenciar tumores de outras lesões não neoplásicas e que não necessitem da realização de um procedimento cirúrgico<sup>60</sup>.

Além da sua importância na classificação das lesões, o exame histopatológico permite avaliar a arquitetura tecidual, a infiltração dos tecidos adjacentes e de vasos sanguíneos e linfáticos, pelas células neoplásicas, bem como fornece informação histomorfológica detalhada sobre o grau de diferenciação, presença ou ausência de pleomorfismo, índice mitótico e presença ou ausência de necrose. É ainda possível avaliar se as margens cirúrgicas de segurança foram satisfatórias<sup>11</sup>.

Para que a análise histopatológica seja fiável, é necessário colher amostras de vários pontos do tumor, procurando abranger zonas de transição entre as lesões e os tecidos aparentemente saudáveis. Assim, é possível avaliar o grau de invasão local, a reação inflamatória adjunta e a existência de lesões displásicas<sup>11</sup>.

Atualmente, várias classificações tem sido propostas, porém a mais utilizada ainda é o método preconizado pela Organização Mundial da Saúde <sup>70</sup>.

#### **a. Neoplasias Malignas**

O carcinoma não-infiltrativo ou *in situ* é formado por nódulos bem demarcados de tecido neoplásico que não invade a membrana basal dos ductos<sup>26</sup>.

O carcinoma simples é o tipo mais comum de tumores mamários na cadela, sendo constituído apenas por um tipo celular, células epiteliais luminiais ou mioepiteliais. Apresenta uma elevada tendência para invadir tecidos adjacentes e vasos sanguíneos e linfáticos, cerca de 50% dos casos<sup>34</sup>. De acordo com a sua diferenciação e comportamento biológico, este tipo de tumor subdivide-se em três tipos, ordenados por grau crescente de malignidade: carcinoma túbulo-papilar, carcinoma sólido e carcinoma anaplásico<sup>34</sup>. O carcinoma túbulo-papilar é frequente na espécie canina e caracteriza-se pela formação de túbulos com projeções papilíferas<sup>34</sup>. O carcinoma sólido caracteriza-se pelo fato das células tumorais se organizarem em densos lençóis, cordões ou ninhos<sup>34</sup>. O carcinoma anaplásico é

o carcinoma com maior grau de malignidade da glândula mamária<sup>26</sup>, trata-se de um tumor difuso e infiltrativo, constituído por células epiteliais de grandes dimensões, geralmente com núcleo bizarro e rico em cromatina, podendo ser multinucleadas. O prognóstico deste tipo de lesão é ruim pois as recidivas são frequentes e tem grande tendência a formação de metástases<sup>34</sup>.

O carcinoma micropapilar é um tipo de neoplasia mamária bastante invasiva e que foi descrita recentemente em cães<sup>71</sup>, por isso não está relatada na classificação histológica da OMS<sup>70</sup>, mas foi inserida na classificação mais recente de Goldschmidt et. al<sup>26</sup>, publicada em 2011. Este tipo de carcinoma mamário forma pequenas papilas intraluminais que não tem apoio fibrovascular e infiltram-se no estroma colagenoso periductal<sup>26</sup>. A anisocariose e anisocitose são de moderada a acentuada e, o índice mitótico é alto. Este tumor apresenta frequentemente invasão vascular e tem um elevado potencial metastático<sup>71</sup>.

O carcinoma complexo é um tipo de neoplasia formada tanto pelo componente epitelial luminal como mioepitelial, em que as células epiteliais luminais se organizam segundo um padrão túbulo-papilífero ou sólido. As células mioepiteliais, por sua vez, dispõem-se de acordo com um padrão reticulado. Apesar do crescimento infiltrativo ser comum, o grau de invasão linfática é bastante baixo, cerca de 10%<sup>26</sup>.

O carcinoma de células fusiformes, carcinoma de células escamosas (CCE), carcinoma mucinoso e carcinoma rico em lipídeos são considerados tipos especiais de carcinomas. O carcinoma de células fusiformes é um tumor relativamente raro no cão, sendo constituído por células fusiformes organizadas em um padrão epitelial e envolvidas por fibras de reticulina, provavelmente alguns tumores deste tipo terão origem mioepitelial<sup>34</sup>. O CCE é constituído por sólidos cordões celulares com zonas de cornificação. A zona central do tumor é composta por queratina lamelar com células tumorais necrosadas, enquanto que na periferia encontram-se células basalóides<sup>34</sup>. É um tumor altamente infiltrativo que geralmente invade a circulação linfática<sup>34</sup>. O carcinoma mucinoso é uma neoplasia rara na espécie canina, caracterizada pela presença de grande quantidade de material mucinoso, produzido pelas células epiteliais<sup>34</sup>. E o carcinoma rico em lipídeos apresenta-se com células arredondadas, de citoplasma abundante e grandes vacúolos, contendo grande quantidade de lipídeos neutros<sup>34</sup>.

O carcinosarcoma é uma neoplasia pouco comum no cão, constituída por células morfológicamente semelhantes às células epiteliais malignas e ao tecido conjuntivo<sup>34</sup>. O tempo de sobrevivência após extirpação cirúrgica é relativamente longo, cerca de 18 meses. As metástases são de tipo carcinomatoso, sarcomatoso ou misto<sup>34</sup>.

Outros tipos de sarcomas também podem ser observados na glândula mamária, os mais comuns são os osteossarcomas e os fibrossarcomas<sup>26</sup>. O fibrossarcoma caracteriza-se pela proliferação de células fusiformes, os fibroblastos, e pela presença de fibras de colágeno<sup>34</sup>. Os osteossarcomas são marcados pela formação de osteóides produzidos pelas células neoplásicas. Nesta categoria tumoral encontram-se os osteosarcomas puros ou combinações de tecido ósseo, fibroso e cartilagenoso<sup>34</sup>. Este tumor tem a via hematogena como via preferencial para formar focos de metástase no organismo, sendo os pulmões os órgãos mais acometidos<sup>26</sup>.

#### **b. Neoplasias Benignas**

O adenoma simples surge muito raramente na cadela. Apresenta-se como lesões nodulares, bem delimitadas, constituídas por células epiteliais luminais ou mioepiteliais<sup>34</sup>. O adenoma complexo é a neoplasia benigna mais comum na cadela e, é constituído tanto por células epiteliais luminais quanto por células morfológicamente semelhantes a mioepiteliais<sup>34</sup>. É por vezes difícil, a distinção entre esta neoplasia e os tumores benignos mistos, fibroadenomas e hiperplasia lobular, porém, o fato de ser encapsulado e apresentar um baixo índice mitótico, bem como ausência de necrose e células atípicas, permite diferenciá-lo dos outros tipos tumorais<sup>26</sup>. Já o papiloma ductal é raro e surge no interior de um ducto distendido, apresentando crescimento papilar ou arborescente, sendo constituído por células epiteliais e/ou mioepiteliais, com rara a presença de mitoses<sup>26</sup>.

#### **c. Lesões Não Neoplásicas**

A hiperplasia ductal é uma lesão caracterizada pela proliferação intraductal de células epiteliais normais ou atípicas, podendo levar à obliteração total ou parcial do

ducto<sup>34</sup>. Estas lesões podem ser difusas ou multifocais e quando o grau de atipia é elevado, passa a designar-se hiperplasia ductal atípica<sup>34</sup>.

Quanto à hiperplasia lobular existem dois tipos, a adenose e a epiteliiose<sup>34</sup>. A adenose consiste no aumento do número de ductos e ácinos por lóbulo, enquanto a epiteliiose caracteriza-se pela proliferação de células epiteliais nos ductos intralobulares<sup>26</sup>.

Em relação às ectasias ductais, estas são o resultado da dilatação progressiva dos ductos, por vezes secundárias à oclusão luminal devido a lesões intraductais, com acúmulo de secreção lipídica<sup>26</sup>.

#### **2.4.4. Graduação Histológica**

A classificação ou gradação histopatológica tem o objetivo de avaliar a arquitetura da neoplasia e as variações morfológicas celulares e nucleares. De acordo com o método sugerido por Elston e Ellis <sup>72</sup>, o grau histológico permite uma correlação significativa com a agressividade do tumor. Esse sistema de classificação é amplamente utilizado na medicina humana. Na medicina veterinária, por sua vez, estudos recentes já adotaram os mesmos critérios, baseados na combinação de características celulares e nucleares, para avaliar carcinomas mamários em cães <sup>5,25,52,73-76</sup>.

De acordo com este sistema, a determinação do grau histológico baseia-se na avaliação do índice de formação de túbulos considerando-se um ponto quando mais de 75% do tumor é constituído por túbulos, dois pontos quando o tumor possui entre 10% a 75% de formações tubulares, e três pontos quando os 10% ou menos, do fragmento de tumor avaliado, for composto por túbulos. Também é levado em consideração o pleomorfismo nuclear, sendo um ponto para núcleos pequenos e regulares, dois pontos para moderado aumento de tamanho e variação morfológica e três pontos para grande variação em tamanho e forma nucleares. Para contagem mitótica, em objetiva 40, utiliza-se um ponto quando forem observadas de zero a uma mitose, dois pontos para três mitoses e, três pontos, acima de três mitoses. Então, o grau histológico do tumor é obtido pela soma das pontuações, o que resulta em um valor total que varia de três a nove, a obtenção



de pontuação final entre três e cinco classifica-se como grau I; seis e sete pontos como grau II e, oito e nove pontos determina-se grau III <sup>5,25,52,73-76</sup>.

O grau histológico é considerado como um indicador prognóstico independente para o câncer de mama primário em mulheres <sup>6,25,52</sup>. Em medicina veterinária, revela uma correlação significativa entre a classificação histopatológica e outros fatores prognósticos como o tipo histológico e tempo de sobrevida <sup>73,76,77</sup>.

### **3. OBJETIVOS E METAS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Comparar os resultados encontrados no exame citológico com o exame histopatológico de tumores mamários malignos com indicações de mastectomia.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Verificar a frequência de distribuição das diferentes neoplasias mamárias malignas em cadelas.
- Identificar o linfonodo sentinela correspondente às massas tumorais localizadas nas diferentes mamas das cadelas.
- Identificar focos de metástases regionais e em órgãos distantes em cadelas com neoplasias mamárias malignas.
- Classificar por meio de histopatologia as neoplasias mamárias malignas em cadelas.
- Determinar a gradação histológica das neoplasias mamárias malignas em cadelas.

#### **3.3. Metas**

- Realizar exame histopatológico de neoplasias mamárias de quarenta e três cadelas.
- Realizar exame citológico de neoplasias mamárias de quarenta e três cadelas.
- Analisar informações sobre raça e idade de quarenta e três cadelas com neoplasias mamárias.
- Determinar a gradação histológica das neoplasias mamárias de quarenta e três cadelas.
- Verificar a eficácia da utilização de azul de metileno 1% na identificação do linfonodo sentinela das neoplasias mamárias malignas de quarenta e três cadelas.
- Diagnosticar focos de metástases regionais e em órgãos distantes em quarenta e três cadelas com neoplasias mamárias malignas.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em uma clínica veterinária localizada na cidade de Goiânia, GO, e no Setor de Patologia Animal (SPA) da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (EVZ/UFG), no período março de 2014 a fevereiro de 2015. Foram avaliadas e acompanhadas 43 cadelas adultas, não castradas, diagnosticadas com neoplasia mamária maligna e encaminhadas à mastectomia. O universo de animais utilizados no estudo, baseou-se na busca ativa desses pacientes junto a uma clínica veterinária particular da cidade de Goiânia – GO, estabelecendo-se assim uma quantidade adequada de animais que permitisse as análises estatísticas.

Primeiramente, os animais foram avaliados clinicamente quanto ao estado geral de saúde, tamanho e localização e aspectos macroscópicos gerais da neoplasia mamária. Os proprietários foram instruídos a responderem a um questionário informando a idade do animal, tempo de evolução do tumor, histórico familiar e saúde da cadela.

Os tamanhos dos tumores foram medidos em centímetros e separados em três categorias: aqueles com diâmetros menores que 3 cm foram classificados como T1, as massas que mediram de 3 a 5 cm foram classificadas como T2 e as maiores que 5 cm, classificadas como T3. A evolução dos casos também foi dividida em três categorias, sendo considerada rápida, para aqueles tumores que tiveram evolução menor que 12 meses; intermediária, com evolução de 12 a 24 meses; e lenta, para neoplasias com evolução em tempo maior que 24 meses.

Após a consulta, estas eram encaminhadas para a realização de ultrassonografia abdominal e radiografia torácica, a fim de detectar-se possíveis metástases em órgãos distantes. Para a análise ultrassonográfica foi utilizado um aparelho modelo 4900, da marca Mindray®, equipado com dois transdutores multifrequenciais de 5 a 10 MHz, sendo uma probe microconvexa e uma linear. Os exames radiográficos foram realizados em três projeções: decúbito lateral direito e esquerdo nas projeções latero-laterais e decúbito dorsal na projeção ventro-dorsal. As técnicas radiográficas basearam-se no método que relaciona a quilovoltagem e miliamperagem, segundo a espessura da região a ser radiografada.

Em seguida, colheu-se material para análise citopatológica das massas pelo método de punção aspirativa por agulha fina (PAAF). Nos casos em que animal

apresentava tumores múltiplos a colheita foi realizada apenas na maior das massas neoplásicas. Para a colheita foram utilizadas agulhas hipodérmicas descartáveis com tamanho 0,70 x 25 mm, seringas descartáveis de 5 ml e lâminas de vidro para microscopia. O material colhido foi imediatamente fixado com metanol por cinco minutos e corado pelo método Giemsa por trinta minutos. A avaliação citomorfológica à microscopia de luz foi realizada de acordo com os critérios preconizados em 2010 por Raskin et al.<sup>65,66</sup>. Os tumores foram classificados quanto ao tipo celular como epitelial, mesenquimal e misto, sendo que tanto os tumores mistos quanto os complexos foram considerados mistos nesta análise.

No estudo citológico, os critérios de malignidade ponderados foram anisocitose, aniscariose, macrocariose, sendo observada também a presença de vacúolos intracitoplasmáticos, basofilia e eosinofilia citoplasmáticas, assim como, a existência de célula em fuso e célula em girino. Observou-se ainda fagocitose, projeções citoplasmáticas, hipercromasia, binucleação, multinucleação, pseudoinclusão e mitose<sup>11,22,62,64</sup>. Todas as amostras foram analisadas e classificadas, por dois patologistas que não tinham conhecimento dos resultados histopatológicos e informações clínicas sobre as pacientes.

Durante a mastectomia, os animais foram submetidos à anestesia geral seguindo o protocolo anestésico adotado pelo serviço de anestesiologia da clínica veterinária aonde ocorreu o procedimento. Como medicação pré-anestésica (MPA) foi utilizada uma associação de 0,3 mg/kg de metadona com 0,03 mg/kg de acepromazina aplicados via intramuscular. Na indução utilizou-se propofol de 3-4 mg/kg com cetamina na dose de 1mg/kg, por via endovenosa. Para a manutenção foi escolhido como protocolo o isoflurano, por via inalatória, com infusão de fentanil. Com a fêmea em decúbito dorsal foi realizada a aplicação intradérmica peritumoral de 0,5 ml/animal de azul de metileno a 1%, para a localização e identificação do linfonodo sentinela. Após dez minutos da aplicação deu-se início ao procedimento cirúrgico de mastectomia e excisão do linfonodo corado pelo azul de metileno. Nos casos, em que o animal apresentava tumores mamários múltiplos, foi colhido para análise histopatológica, apenas a maior das massas neoplásicas e seu respectivo LS.

Após a exérese tumoral e do LS correspondente, as amostras foram acondicionadas em recipientes de boca larga, devidamente identificados, contendo solução

fixadora aquosa de formolína a 10%, neutro e tamponado. O material colhido permaneceu 48 horas submerso no fixador para adequada preservação das amostras e posteriormente era mantido em álcool 70% até o momento do processamento e da inclusão em parafina. Os fragmentos, com espessura de 5µm, foram seccionados em micrótomo automático (Modelo RM 2255, Leica®, Alemanha) distendidos sobre lâminas histológicas e coradas pela técnica de hematoxilina-eosina (HE). As lâminas foram montadas com resina sintética (Entellan, Merck®, Alemanha) e lamínulas histológicas.

A análise histopatológica foi realizada em microscópio óptico de campo claro, sendo que as neoplasias mamárias foram classificadas de acordo com o proposto pela Organização Mundial da Saúde (OMS) <sup>70</sup> e graduadas segundo o método proposto por Elston e Ellis <sup>72</sup>. Para a determinação do carcinoma micropapilar, que não está contemplado pela classificação histológica da OMS <sup>70</sup>, utilizou-se a classificação mais recente de Goldschmidt et. al <sup>26</sup> publicada em 2011, que inclui este último tipo de carcinoma.

A gradação histológica foi realizada apenas nos tumores de origem epitelial, sendo esta baseada na avaliação de formação de túbulos, pleomorfismo nuclear e contagens mitóticas. Cada um desses parâmetros foi classificado em três categorias, a qual uma pontuação de um a três foi atribuída. Para a formação de túbulos, os tumores contendo mais de 75% da sua extensão formada por túbulos receberam um ponto, aqueles com 10 a 75% do tumor com formação tubular receberam dois pontos e, para os que apresentavam menos de 10% de túbulos atribuiu-se três pontos. Quanto ao pleomorfismo nuclear, adotou-se o seguinte critério, para células pequenas com núcleos regulares atribuiu-se um ponto; aquelas com tamanho e variação nuclear moderados receberam dois pontos e as que apresentavam variação nuclear acentuada, três pontos. De acordo com o número de mitoses por campo, utilizando-se uma objetiva de 40x, considerou-se de zero a uma mitose, um ponto; duas a três mitoses somaram dois pontos, e campos com mais de três mitoses tiveram pontuação igual a três.

As pontuações dos três parâmetros foram então somadas para a obtenção do grau do tumor. Tumores que receberam pontuação de três a cinco pontos foram considerados tumores bem diferenciados e classificados como Grau I. Aqueles que somaram de seis a sete pontos foram considerados moderadamente diferenciados e classificados como Grau

II. Por último, os tumores que tiveram pontuação de oito a nove foram classificados como Grau III.

Posteriormente foi realizada a tabulação de todos os dados, as variáveis de distribuição das neoplasias mamárias e seus respectivos linfonodos sentinelas, assim como as características macro e microscópicas observadas foram analisadas segundo estatística descritiva, empregando distribuição de frequência.

Ao restante da análise estatística foi realizada pelo método de regressão linear múltipla por meio de uma matriz de correlação das variáveis. Para validar tal correlação foi feito o Teste de Pearson para cada uma das variáveis analisadas. Os resultados encontrados nos exames citológico e histopatológico foram distribuídos em tabelas de contingência e as hipóteses foram comparadas e analisadas por correlação não paramétrica, visando estabelecer padrões de distribuição de resultados nas variáveis estudadas, com nível de significância de 5%.

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA-PRPI-UFG, sob Protocolo nº. 120/2014. Os proprietários dos animais foram previamente informados sobre o procedimento e assinaram termo compulsório de autorização para a participação dos animais no estudo.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Anamnese e aspectos clínicos

Neste estudo, predominaram cães sem raça definida (SRD) (33%), seguidos pelas raças Poodle (21%), Pitbull (16%) e das raças Daschund (9%) e Fila Brasileiro (9%), Cocker Spaniel Inglês (5%), Boxer (5%) e Shih Tzu (2%).

Quanto à faixa etária das cadelas com tumores de mama, 7% (n=3) apresentaram idade entre cinco a seis anos, 17% (n=8) variaram entre sete e oito anos, 23% (n=10) entre nove e dez anos e 53% (n=22) tinham idade superior a dez anos.

Dos 43 casos estudados neste experimento, 25 animais (58%) apresentavam a maior massa neoplásica localizada no par mamário inguinal, 11 no par mamário abdominal caudal (25%), cinco em par mamário abdominal cranial (12%) e, apenas duas situavam-se em pares mamários torácicos (5%).

No que se refere aos tamanhos das massas tumorais, oito (18,60%) animais avaliados foram classificados como T1; 15 (34,90%) como T2 e 20 (46,50%), T3. Não houve diferença estatística entre os diferentes tipos de neoplasias diagnosticadas em relação ao tamanho do tumor. A relação entre o tamanho do tumor e o tipo histológico é demonstrado no Quadro 1.

Quadro 1. Diagnóstico histopatológico e tamanho de tumores mamários de 43 cadelas submetidas a mastectomia no período de julho de 2014 a agosto de 2015, Goiânia, Goiás.

<b>TIPO HISTOLÓGICO</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>
Carcinoma Complexo	3	6	1
Carcinoma Sólido	2	2	3
Carcinossarcoma	1	2	3
Carcinoma Anaplásico	-	1	5
Carcinoma Túbulo-papilar	-	1	4
Sarcoma	1	2	1
Carcinoma Micropapilar	1	1	1
Tipos especiais de carcinomas	-	-	2
<b>TOTAL</b>	<b>8 (18,60%)</b>	<b>15 (34,90%)</b>	<b>20 (46,50%)</b>

A evolução dos casos também foi dividida em três categorias, sendo elas rápida, para aqueles tumores que tiveram evolução menor que 12 meses; intermediária, com evolução de 12 a 24 meses; e lenta, para neoplasias com evolução em tempo maior que 24 meses. Um total de 17 animais (39,53%) apresentaram evolução rápida, 15 (34,88%) tiveram evolução intermediária e 11 (25,59%) evoluíram de maneira lenta (Quadro 2). Não houve diferença estatística entre os tipos histológicos em relação ao tempo de evolução clínica do tumores.

Quadro 2. Diagnóstico histopatológico e evolução clínica de tumores mamários de 43 cadelas submetidas a mastectomia no período de julho de 2014 a agosto de 2015, Goiânia, Goiás.

<b>TIPO HISTOLÓGICO</b>	<b>RÁPIDA</b>	<b>INTERMEDIÁRIA</b>	<b>LENTA</b>
Carcinoma Complexo	1	6	3
Carcinoma Sólido	3	2	2
Carcinossarcoma	3	-	3
Carcinoma Anaplásico	4	2	-
Carcinoma Túbulo-papilar	2	1	2
Sarcoma	3	1	-
Carcinoma Micropapilar	1	2	-
Tipos especiais de carcinomas	-	1	1
<b>TOTAL</b>	<b>17 (39,53%)</b>	<b>15 (34,88%)</b>	<b>11 (25,59%)</b>

## 5.2. Identificação do Linfonodo com Azul de Metileno

No presente estudo, o azul de metileno marcou o LS em todos os casos, sem causar alterações de cor nos tecidos adjacentes e também não foram notados sinais de alergia ou intoxicação em nenhuma das 43 pacientes (Figura 1). Observou-se, também, que a quantidade de 0,5mL foi suficiente para a marcação e identificação do LS com azul de metileno a 1%.

Todos os tumores localizados em pares inguinais e abdominais tiveram como LS, o linfonodo inguinal superficial. E aqueles com localização torácica, drenaram para o linfonodo axilar.





Figura 1 - Cadela posicionada em decúbito dorsal para realização de mastectomia bilateral total. (A) Observa-se a presença de nódulos em mama inguinal esquerda, mama torácica esquerda e mama torácica direita. Nota-se ainda marcação de coloração azul, da via linfática, indicando a drenagem do nódulo tumoral até o linfonodo sentinela. (B) Procedimento cirúrgico, após incisão das camadas epitelial e subcutânea, observando-se a marcação dos vasos linfáticos pelo corante, sem impregnação dos tecidos adjacentes, possibilitando a identificação do linfonodo sentinela.

### 5.3. Resultados dos Exames Citológicos

Citologicamente, os carcinomas, em geral, apresentaram alta celularidade, grupos celulares pouco coesos ou células isoladas, anisocariose e nucléolos proeminentes. Apresentaram tipicamente camadas e agregados de células epiteliais pleomórficas com alta relação núcleo-citoplasma, além de núcleos basais arredondados e em geral, exibiram mais que três características de malignidade (Figura 2). Estruturas acinares, produto secretório e vacúolos citoplasmáticos também foram observados. Já o carcinoma de células escamosas

mostrou-se em grupos de células dispostas segundo um padrão sincicial, viu-se a queratinização de células malignas, que no tecido ocasionaram a formação de pérolas de queratina.

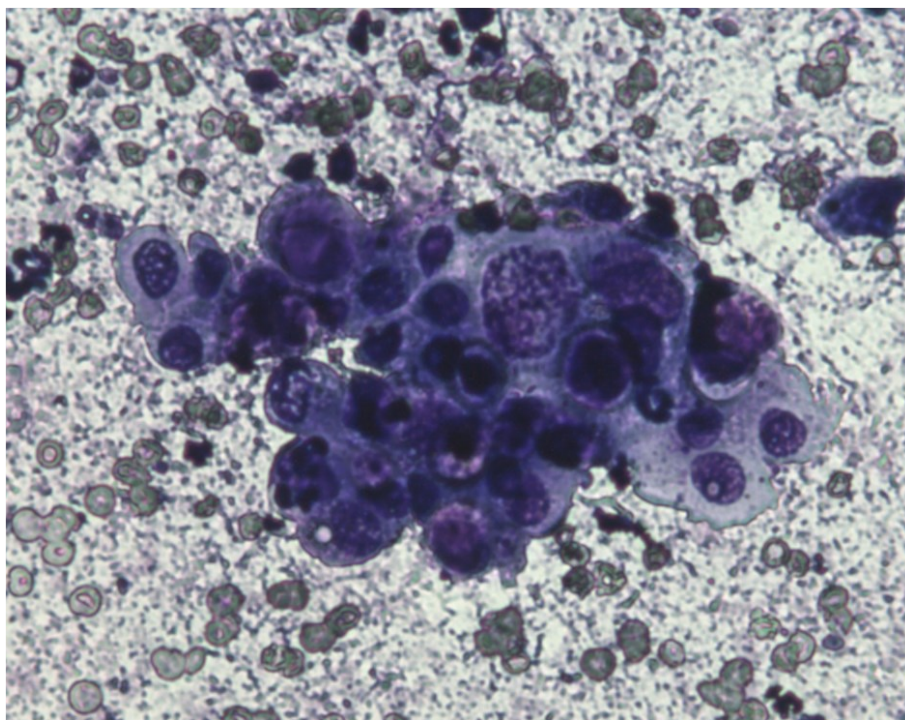


Figura 2. Fotomicrografia da citologia de glândula mamária, em cadela com carcinoma mamário. Observa-se agregados de células epiteliais de aspecto neoplásico, com acentuados pleomorfismo, anisocitose e anisocariose. Giemsa, 40x. (Fonte: SPA/EVZ/UFG)

Os aspirados de tumores mamários mistos malignos revelaram células epiteliais e fusiformes, de origem mesenquimal ou mioepitelial, sendo que uma ou ambas destas populações exibiram características de malignidade (Figura 3). Comumente também são vistos elementos cartilaginosos ou ósseos.

Os tumores mesenquimais observados neste estudo foram hemangiossarcomas e osteossarcomas, e apresentaram aspecto citológico semelhante àquele verificado em outros tecidos. Os sarcomas, em geral, esfoliaram pouco resultando em amostras de baixa celularidade e caracterizaram-se por apresentarem células irregulares a fusiformes dispostas individualmente e em pequenos aglomerados.

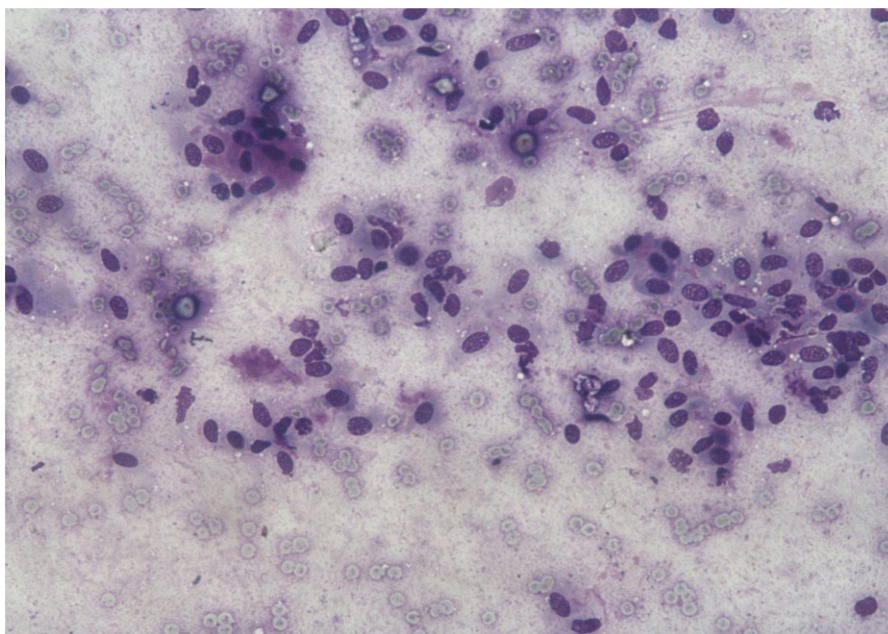


Figura 3. Fotomicrografia da citologia de glândula mamária, em cadela com tumor misto benigno. Observa-se células epiteliais e mioepiteliais bem diferenciadas apresentando discreta anisocitose e anisocariose. Giemsa, 10x. (Fonte: SPA/EVZ/UFG)

#### 5.4. Diagnóstico Histopatológico

O diagnóstico histopatológico é considerado a análise padrão ouro para o diagnóstico de neoplasias mamárias. Pelo exame histopatológico, os tipos de neoplasias mais observadas, neste estudo, foram carcinoma complexo (22%), carcinoma sólido (16%), carcinossarcoma (14%), carcinoma anaplásico (14%), carcinoma túbulo-papilar (12%), sarcomas (hemangiossarcoma e osteossarcoma) (10%); carcinoma micropapilar (7%) e tipos especiais de carcinomas (carcinoma de células escamosas e carcinoma de células fusiformes) (5%).

Foram classificados como carcinomas túbulo-papilares os tumores nos quais a arquitetura tecidual se organizava em túbulos e papilas. Estas papilas se estendiam para o lúmen tubular, em formas sésseis ou papilares pedunculadas, e eram suportadas por um estroma fibrovascular de tecido conjuntivo (Figura 4).



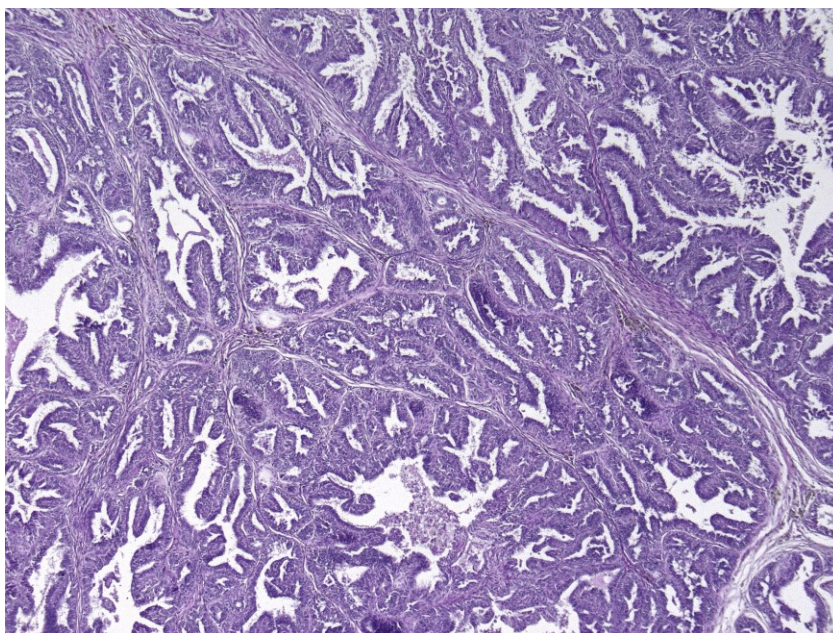


Figura 4. Fotomicrografia de Carcinoma túbulo-papilar, com proliferação de células epiteliais de aspecto neoplásico, acompanhada por fina sustentação de estroma, apresentando arranjo túbulo-papilar. HE, 10x.

Nos carcinomas sólidos notou-se que as células eram predominantemente dispostas em folhas contínuas, cordões, ou massas bem densas, sem lúmen. Neste, verificou-se anisocariose e anisocitose de moderada a acentuada, e o número de mitoses variou de duas a três por campo (Figura 5). Em alguns casos também se observou infiltração de células neoplásicas em vasos linfáticos na periferia da neoplasia, e consequentemente com metástases nos respectivos linfonodos regionais. Em todos os casos de carcinomas sólidos viu-se áreas de necrose no interior das massas.

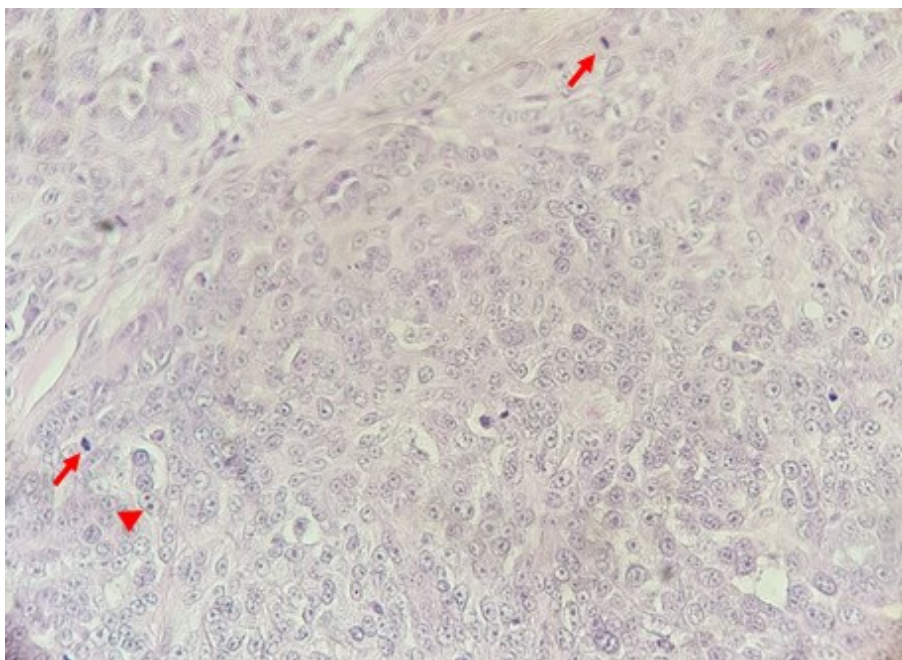


Figura 5: Fotomicrografia de Carcinoma Sólido de glândula mamária, em cadela. Verificando-se intensa proliferação de células epiteliais com distribuição e aspecto sólido, células neoplásicas com acentuado pleomorfismo, anisocitose, anisocariose, elevada relação núcleo citoplasma e com um ou mais nucléolos evidentes (cabeça de seta). Além de figuras de mitose (setas). HE. 40x.

O carcinoma anaplásico apresentou, neste estudo, invasão difusa de células neoplásicas no tecido conjuntivo intralobular, tecidos linfáticos e vasos sanguíneos. As células neoplásicas foram vistas individualizadas ou agrupadas em formato espacial de pequenos cachos. O pleomorfismo, a anisocitose e a anisocariose foram acentuados, verificando-se também nucléolos evidentes, variando de uma a três por núcleo. O índice mitótico foi elevado, assim como a presença de células multinucleadas.

No carcinoma micropapilar mamário notou-se a formação de pequenas papilas intraluminais sem apoio fibrovascular e que infiltravam no estroma periductal. Observou-se moderado a acentuado pleomorfismo, anisocitose e anisocariose e, o índice mitótico foi elevado. Este tumor apresentou intensa invasão vascular e linfática, mostrando um potencial metastático elevado (Figura 6).

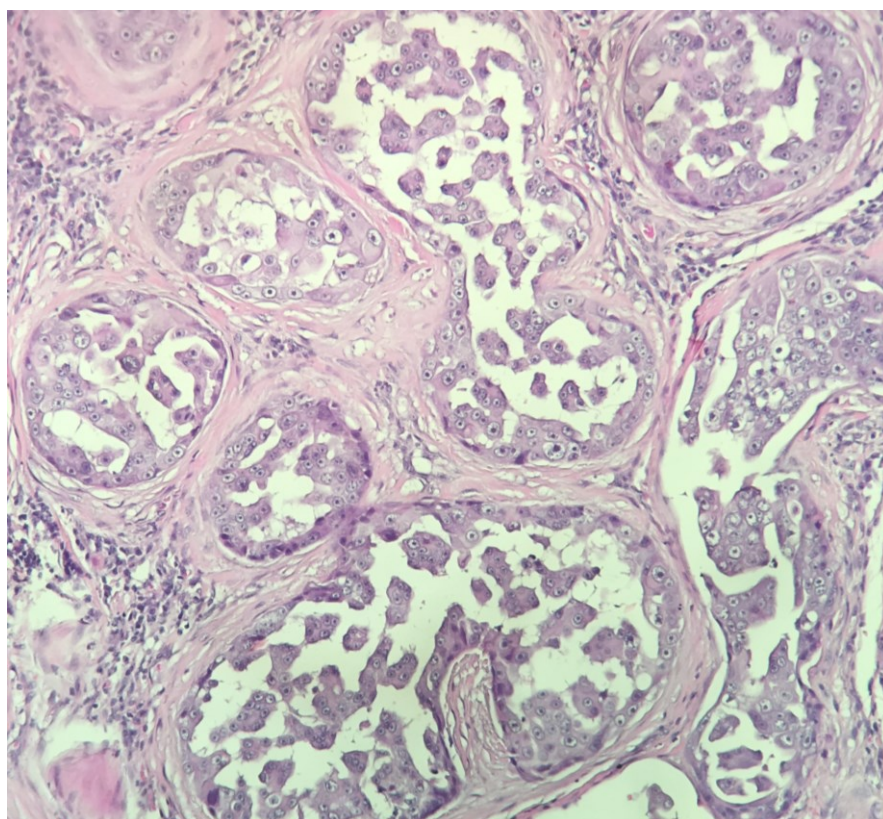


Figura 6. Fotomicrografia de tecido mamário, de uma cadela, SRD, apresentando proliferação de células epiteliais intraductais, que se apresentam em aglomerados, separadas por espaços lacunares vazios. Não há estroma evidente. HE 40X.

O único caso de CCE mostrou-se composto por células epiteliais da camada escamosa. As características histopatológicas deste tumor foram idênticas às que ocorrem na pele, com a presença de ilhas e cordões de células epiteliais frequentemente associados a pérolas de queratina. As células e os núcleos observados eram grandes e produziam filamentos de queratina intracitoplasmático.

Nos carcinomas complexos notou-se a presença de componente epitelial maligno associado a elementos mioepiteliais benignos apoiados por um estroma fibrovascular. A população de células epiteliais era arranjada em túbulos irregulares e exibiam moderada a acentuada anisocitose e anisocariose e, o número de mitoses variou de zero a dois. A população mioepitelial era constituída por células fusiformes ou mioepiteliais dentro do interstício, dispostas em feixes dentro de uma matriz mixóide, basofílica e irregular. Estas células apresentavam bordos indistintos, com anisocariose e



anisocitose foram discretas (Figura 7). Na maioria dos casos estudados, na periferia da neoplasia puderam ser notados alguns focos inflamatórios.

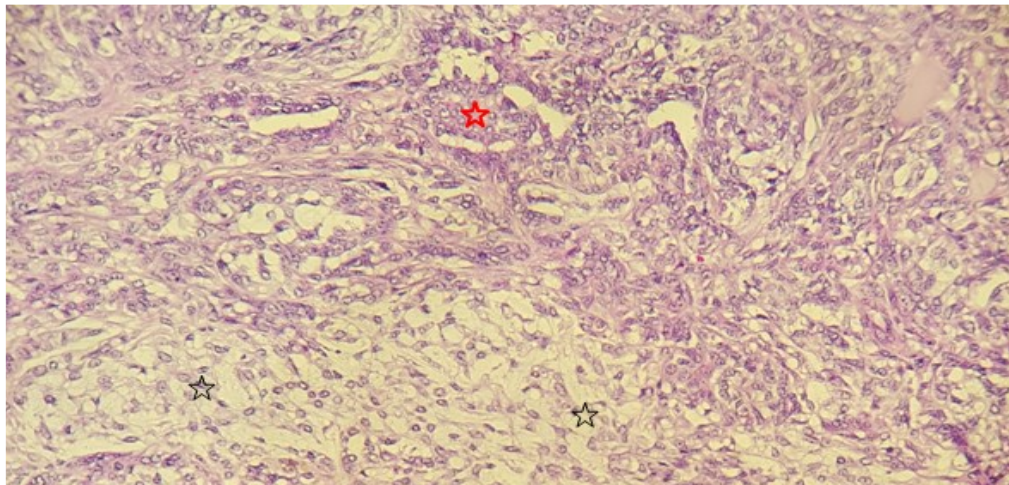


Figura 7. Fotomicrografia de Carcinoma Complexo verificando-se a proliferação de células epiteliais (estrelas vermelhas) apresentando moderado pleomorfismo, anisocitose e anicariose, relação núcleo citoplasma elevada e baixo índice mitótico. As células mioepiteliais apesar de estarem proliferadas, são bem diferenciadas, com aspecto semelhante aqueles observados no tecido normal (estrelas pretas). HE. 40x.

Os carcinosarcomas, por sua vez, eram compostos por um componente epitelial, apresentando de moderado a acentuado pleomorfismo, anisocitose e anisocariose, com nucléolos evidentes e índice mitótico variando de discreto a acentuado. Também era constituído por uma porção de tecido análogo a tecido cartilaginoso ou ósseo, no entanto também com aspectos de malignidade (Figura 8).

Entre os sarcomas mamários, o osteossarcoma exibiu proliferação celular que variou morfológicamente entre fusiforme, estrelada e ovoides, associadas a ilhas de osteoide tumoral ou à formação óssea. Apresentava elevados índices mitóticos, anisocitose e anisocariose acentuadas. Já o hemangiossarcoma exibia áreas de hemorragia difusas e proliferação de células mesenquimais, com anisocitose e anisocariose variando de moderada a acentuada. Figuras de mitoses e infiltrados de polimorfonucleares estavam presentes na maioria dos casos analisados.

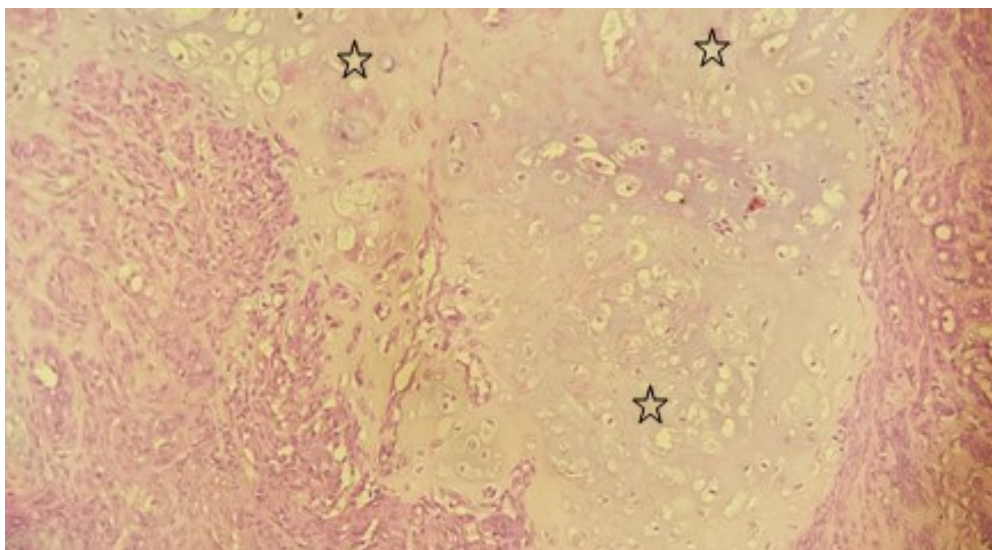


Figura 8. Fotomicrografia de Carcinossarcoma de glândula mamária, em cadela, observando-se características de malignidade tanto nas células epiteliais como no tecido cartilagenoso, oriundo de diferenciação mesenquimal (estrelas). HE. 10x.

Os graus histológicos foram avaliados nos 39 casos de carcinomas. Destes 39 casos, seis (15,38%) foram classificados como Grau I; 16 (41,02%) foram Grau II e 17 (43,60%), Grau III (Quadro 3).

Quadro 3. Diagnóstico e gradação histológica de tumores mamários de 39 cadelas submetidas a mastectomia no período de julho de 2014 a agosto de 2015, Goiânia, Goiás.

TIPO HISTOLÓGICO	GRAU 1	GRAU 2	GRAU 3
Carcinoma Complexo	2	6	2
Carcinoma Sólido	-	3	4
Carcinossarcoma	1	2	3
Carcinoma Anaplásico	-	2	4
Carcinoma Túbulo-papilar	3	2	-
Carcinoma Micropapilar	-	1	2
Tipos especiais de carcinomas	-	-	2
<b>TOTAL</b>	<b>6 (15,38%)</b>	<b>17 (41,02%)</b>	<b>20 43,60%)</b>

### 5.5. Exame citológico X Exame histopatológico



Ao se realizar a análise estatística, utilizando-se uma correlação não paramétrica com nível de significância de 99%, verificou-se que a avaliação citopatológica apresentou 95% de acerto quando comparada aos resultados histopatológicos.

## **5.6. Metástases**

As variáveis diâmetro do tumor e tempo de evolução apresentaram baixa correlação (12,9%), quando comparadas conjuntamente, com o aparecimento de metástases, sejam elas regionais ou distantes. Avaliadas individualmente, o tamanho do tumor e a evolução da doença não apresentaram correlação estatística com a presença de metástases, neste modelo experimental. Quanto a faixa etária, o índice de correlação com a presença de metástase foi de 36,1%, porém esse valor ainda é considerado baixo.

A classificação histopatológica apresentou alta correlação com a presença de metástases, sendo em torno de 73% com 99% de confiança, tanto para metástases em LS quanto para órgãos distantes. A partir desses dados, a única variável que apresentou correlação positiva com a formação de metástase foi a classificação histológica do carcinoma.

Dentre os casos de metástases regionais, os tipos histopatológicos mais frequentemente encontrados foram carcinoma micropapilar, carcinossarcoma e carcinoma anaplásico, nos quais 67% desses casos apresentaram metástase no momento do diagnóstico. Em relação às demais neoplasias, estatisticamente, 50% dos sarcomas analisados, neste estudo, apresentaram metástases regionais, os carcinomas sólidos metastatizaram, para o LS, em 43% dos casos, os carcinomas túbulo-papilares em 40% e os carcinomas complexos em apenas 10% dos casos observados.

Dos vinte animais, em que se observou metástases nos linfonodos sentinelas, oito já apresentavam massas tumorais em órgãos distantes. Os tipos histológicos envolvidos nessas metástases foram carcinoma anaplásico (37,5%), carcinossarcoma (25%), carcinoma micropapilar (12,5%), carcinoma sólido (12,5%) e sarcoma (12,5%). Todas as metástases distantes estavam localizadas preferencialmente nos pulmões, sendo que em apenas duas cadelas os nódulos também estavam presentes no fígado e no baço.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Anamnese e aspectos clínicos

Quanto a raça, um estudo realizado no Irã mostrou que os animais mais acometidos também foram os SRD e posteriormente as raças Pastor Alemão, Dachshund e Pequinês<sup>6</sup>. No nordeste da Itália notou-se que as raças Samoieda, Doberman, Schnauzer e Yorkshire Terrier foram de maior ocorrência<sup>50</sup>. No sul do Brasil, os SRD também foram os mais prevalentes, seguidos da raça Poodle, Cocker Spaniel, Dachshund, Pastor Alemão e Pinscher<sup>51</sup>. Apesar de alguns estudos não contabilizarem os cães SRD em sua estatística, nota-se que a prevalência de raças acometidas por neoplasias mamárias muda bastante de acordo com a localização geográfica de cada estudo, bem como as características sócio econômicas da região em que o estudo foi desenvolvido. Apesar de no Brasil existir uma grande quantidade de cães SRD, o maior número de animais SRD encontrados neste trabalho, bem como as raças mais acometidas, retrata somente uma realidade pontual da população amostral deste experimento.

No presente estudo, a frequência de tumores mamários malignos apresentou resultados significativos quando associada com a idade, sendo menos frequente em cadelas com idade inferior a seis anos e, aumentando até 70% para os animais com idades acima de sete anos. Estes resultados são compatíveis com os observados por outros autores que relataram que a idade média de ocorrência de tumores mamários em cadelas varia entre oito e dez anos, sendo que o desenvolvimento de neoplasias malignas antes dos cinco anos de idade é fato bastante raro<sup>6,11,37,50,8,78</sup>. Visto que nenhuma das cadelas deste estudo era castrada, os resultados observados podem ser explicados pela hormônio-dependência da neoplasia mamária. Sabe-se que o câncer de mama está diretamente ligado à estimulação hormonal ovariana, então, quanto mais avançada for a idade da fêmea, mais ciclos estrais terão ocorrido ao longo de sua vida e, portanto terá havido maior estimulação realizada pelo progesterona, estrógeno, andrógeno, prolactina e hormônio do crescimento, favorecendo o surgimento tumoral<sup>7,33</sup>.

Assim como o observado neste estudo, Shafiee et al.<sup>6</sup> relataram de forma semelhante a localização preferencial de neoplasias mamárias em cadelas, onde os tumores

nas mamas inguinais totalizaram 60%, seguidos dos pares abdominais com 27% e, por último, os pares torácicos com 13%, mostrando compatibilidade de dados entre ambos os estudos. O motivo do maior número de massas afetarem o lobo inguinal, provavelmente se dá em decorrência do maior volume de tecido mamário presente nestes últimos pares.

Em relação ao tamanho da massa tumoral, a maioria dos casos (46,50%) foi classificado como T3, ou seja, tinham diâmetros maiores que 5 cm, fato já esperado pois o estudo incluiu apenas tumores malignos e a literatura disponível confirma que tumores benignos tem tamanhos menores que tumores malignos<sup>25,79,80</sup>. Acredita-se que esse elevado índice de tumores de grande diâmetro esteja relacionado com o tempo entre o aparecimento do tumor e o diagnóstico definitivo, pois proprietários e, às vezes, até mesmo médicos veterinários tendem a negligenciar pequenas nodulações, e já é sabido que o tempo prolongado possibilita a progressão de tumores benignos para malignos<sup>10,27,51</sup>.

Observou-se ainda que o tipo histológico que apresentou maior tamanho foi o carcinoma anaplásico, com mais de 83% dos casos classificados como T3. Sabe-se que o carcinoma anaplásico é considerado a neoplasia mamária com maior grau de malignidade, quando comparada aos demais tipos histológicos, com elevado índice mitótico e alta capacidade de crescimento tanto expansivo, quanto infiltrativo<sup>81</sup>.

Apesar de não ter tido diferença estatística entre os tempos de evolução da doença, os valores absolutos mostraram que a maioria dos animais tiveram evolução rápida. Tumores mais agressivos tendem a evoluir mais rapidamente<sup>49</sup> e, mais uma vez, observou-se que o carcinoma anaplásico abrange a maioria de casos (67%) classificados como evolução rápida.

## **6.2. Diagnóstico Histopatológico e Citopatológico**

Estudo realizado no Irã, em 2014, com 37 animais, utilizando a mesma classificação do presente trabalho, sem considerar o diagnóstico de carcinoma micropapilar invasivo, mostrou elevada frequência de carcinomas simples (túbulo-papilares, sólidos e anaplásicos), seguido de carcinomas complexos, quando comparados aos demais tipos histológicos de neoplasias mamárias<sup>82</sup>. No presente estudo verificou-se também alta prevalência de carcinomas simples e tumores complexos, assim como observado em outros

estudos, mesmo naqueles que utilizaram métodos diferentes de classificação histopatológica<sup>6,27,34,51</sup>.

Os carcinomas túbulo-papilares são carcinomas simples, e é o tipo histológico que mais se assemelha a estrutura tecidual fisiológica, devido a formação de túbulos e papilas. Nos carcinomas sólidos, devido ao crescimento rápido e ao tamanho do tumor, os vasos sanguíneos não chegam até o centro da massa e este tecido, por não receber suporte nutricional adequado, forma áreas de necrose. Este fato pode ser notado em todos os casos de carcinomas sólidos analisados neste estudo.

O carcinoma anaplásico é o mais maligno dos carcinomas mamários, muitas vezes mostrando invasão difusa de células neoplásicas no tecido conjuntivo intralobular, tecidos linfáticos e vasos sanguíneos<sup>83</sup>, por este motivo é tão comum o elevado índice mitótico e a intensa anisocitose, anisocariose, pleomorfismo celular e presença de nucléolos evidentes e células multinucleadas. O carcinoma micropapilar é um tipo de neoplasia mamária bastante invasiva e que foi recentemente descrita em cães<sup>71</sup>, por isso não está relatada na classificação histológica da OMS<sup>70</sup>, mas foi inserida na classificação mais recente de Goldschmidt et. al<sup>26</sup> publicada em 2011.

O único caso de CCE mostrou-se composto unicamente por epitélio escamoso, que provavelmente tenha se originado de células epiteliais ductais que sofreram metaplasia escamosa e posterior transformação neoplásica. Normalmente é difícil diferenciar carcinomas de células escamosas que tem a sua origem na glândula mamária daqueles que se originaram na epiderme e invadem a glândula subjacente. Histologicamente, o tumor visto foi idêntico aos que ocorrem na pele, com a presença de ilhas e cordões de células epiteliais frequentemente associados a pérolas de queratina.

Entre os sarcomas mamários, o osteossarcoma é a neoplasia mesenquimal mais comumente observada na glândula mamária canina, e revela muitas vezes um histórico recente de crescimento rápido de uma massa mamária que esteve presente durante alguns anos exibiu proliferação celular que variou morfológicamente entre fusiforme, estrelada e ovoides, associadas a ilhas de osteóide tumoral ou a formação óssea.

No presente estudo ficou evidente a relação entre o tipo de carcinoma mamário e sua gradação histológica. Carcinomas anaplásicos, considerados pela literatura tumores que apresentam alta malignidade<sup>70,71</sup>, foram todos classificados como grau III. Os

carcinomas complexos receberam, na sua maioria classificação em graus I e II, pois segundo alguns autores, os tumores que apresentam tecidos epiteliais e mioepiteliais têm comportamento biológico menos agressivo quando comparado aos carcinomas simples <sup>84,85</sup>. Descrições similares foram relatadas em pacientes humanos por Elston e Ellis <sup>86</sup>. Já Tavasoly et al. <sup>82</sup> mencionam que os carcinomas túbulo papilares foram em sua maioria graduados como I e II, e os carcinomas anaplásicos classificados como grau II e III, e por último, os carcinomas sólidos, notadamente mais malignos e com pior prognóstico, classificados como grau III. Para os tipos especiais de carcinomas, todos foram classificados como grau III, tanto no presente estudo, quanto nos demais trabalhos consultados <sup>6,27,82</sup>.

Estudos que correlacionaram o tempo de sobrevida com o grau histológico mostram que cães com carcinomas mamários de grau I tem melhor prognóstico do que aqueles classificados como grau II e III, porém não existe diferença prognóstica significativa entre os dois últimos graus <sup>74</sup>, no entanto devido ao período exíguo deste experimento não foi possível analisar este tipo de dado.

### **6.3. Exame citológico X Exame histopatológico**

A elevada correlação dos resultados citológicos com o diagnóstico histopatológico descrito nestes estudo, foi igualmente mencionado em trabalhos mais recentes que mostraram concordâncias de 93% <sup>6</sup>, 81% <sup>12</sup> e 96,5% <sup>87</sup>, entre estes exames.. Por outro lado, Cassali et al. <sup>11</sup> encontrou valores menores de correlação positiva, pouco mais de 67% dos casos.

Embora não tenha ocorrido nenhum tipo de problema na colheita, processamento ou análise das amostras citológicas, deste estudo, é importante ressaltar que o sucesso da citologia aspirativa depende das diversas fases de condução da técnica, desde a obtenção da amostra, da preparação da lâmina e sua coloração, até o exame microscópico do material aspirado. As dificuldades impostas a um ou mais passos da técnica poderão afetar os resultados <sup>28</sup>. Porém, a maior dificuldade na obtenção de um diagnóstico citológico acurado em neoplasias mamárias de cadelas, ocorre devido a elevada heterogeneidade do tecido, no qual a morfologia das células é variável em diferentes áreas

do tumor, assim como a presença de inflamação e necrose que podem mascarar ou impossibilitar diagnósticos <sup>12,65</sup>.

A importância de se validar o exame citológico se dá por se tratar de um exame minimamente invasivo, de fácil execução, sem riscos ao paciente e de baixo custo, que por ser realizado antes da cirurgia pode predizer melhor prognóstico e indicar o protocolo terapêutico adequado para cada caso.. Contudo, é importante ressaltar que tanto na medicina humana, quanto na medicina veterinária, a citologia aspirativa é um exame de triagem, pois, ainda que esporadicamente, podem ocorrer resultados não compatíveis com o resultado final da biópsia<sup>11,12</sup>.

#### **6.4. Identificação do Linfonodo**

A técnica de marcação pelo Azul de metileno a 1% demonstrou ser eficiente na localização dos linfonodos no momento da cirurgia, facilitando a extirpação e permitindo identificar com precisão o LS correspondente a cada massa neoplásica. Campos et al. <sup>88</sup> também obtiveram bons resultados com a utilização do azul de metileno, na detecção do LS em cães. Na medicina humana, o uso deste mesmo corante mostrou-se seguro para identificação do LS, no câncer de mama<sup>89</sup>.

No presente estudo, o azul de metileno marcou o LS em todos os casos, sem causar alterações de cor nos tecidos adjacentes e também não foram observados sinais de alergia ou intoxicação em nenhuma das 43 pacientes. Estudos recentes mencionam resultados semelhantes em relação a coloração exclusiva do LS, sem ocorrência de dano aparente ao animal <sup>19,90</sup>. Entretanto, em humanos foi descrito o desenvolvimento de toxicidade relacionada à dose, causando anemia hemolítica, arritmias cardíacas, descamação de pele, dor abdominal, pele e urina azuladas, além de hiperbilirrubinemia<sup>91</sup>, também foram mencionadas reações localizadas, como necrose da pele, de tecidos subcutâneos e presença de abscessos necróticos, bem como edema pulmonar em uma mulher adulta <sup>89</sup>. Em casos de alergia aos marcadores azuis, a utilização de hemossiderina é recomendada <sup>92</sup>.

Observou-se neste estudo que a quantidade de 0,5mL foi suficiente para a marcação e identificação do LS com azul de metileno a 1%, quantidade bem inferior a recomendada pela literatura consultada que recomendam a utilização de 1 a 2mL <sup>19,90</sup>. Esta

diminuição na dose permite a redução das chances de complicações, principalmente alérgicas, bem como do custo com material utilizado. Tratando-se, portanto, de procedimento que pode ser prontamente adotado por cirurgiões veterinários e que ainda não havia sido relatado na literatura consultada.

Reafirmando os resultados apresentados, neste experimento, estudo conduzido por Khatib et al.<sup>19</sup>, em cadelas hígidas, demonstrou que a vascularização linfática proveniente dos três primeiros pares de mama drena para os linfonodos axilares e que os três últimos pares de mamas drenam para os linfonodos inguinais superficiais. Outro estudo<sup>51</sup> analisou 132 casos de necropsia em cadelas com neoplasia mamária observou também a presença de metástase nos linfonodos, indicando assim a drenagem linfática para o LS, que ocorreu principalmente nos linfonodos inguinais superficiais e intratorácicos seguidos pelos axilares (30,77%).

## **6.5. Metástases**

É consenso entre a maioria dos autores que o tamanho das neoplasias mamárias apresentam-se diretamente relacionadas com o prognóstico, assim tumores maiores que três centímetros tem relação direta com índices de recorrência da doença<sup>93</sup>, enquanto que as massas menores estão correlacionadas com maior tempo de sobrevida em cães<sup>56</sup>. Embora o tamanho do tumor não tenha apresentado correlação estatística significativa com a presença de metástases, neste modelo experimental, foi possível observar que todas as massas classificadas como T1 não apresentaram metástases regionais, conferindo prognóstico mais favorável.

A classificação histopatológica, como esperado, apresentou alta correlação com a formação de metástases, resultado que se encontra embasado no grau de malignidade referente aos diferentes tipos de carcinomas. Sendo que os que mais apresentaram metástase foram justamente os carcinomas micropapilares, carcinomas anaplásicos e carcinossarcomas, que são considerados na literatura como neoplasias mamárias de alta malignidade e consequentemente apresentam prognóstico desfavorável.

Desta forma, os carcinomas complexos têm melhor prognóstico quando comparado aos carcinomas simples pois apresentam crescimento expansivo e as células raramente se desprendem uma das outras, característica que dificulta a formação de

metástases<sup>84</sup>. Os carcinomas simples, por sua vez, apresentam comportamento biológico mais agressivo. Os carcinomas anaplásicos e os carcinomas micropapilares são neoplasias altamente malignas com capacidade infiltrativa, índice mitótico alto e elevado potencial metastático<sup>71,83</sup>.

Sendo assim apesar de somente o tipo histológico ter apresentado relação significativa com o desenvolvimento de metástase, pode-se verificar que a maioria dos carcinomas anaplásicos apresentaram grandes massas, evolução rápida e elevado índice metastático. Características semelhantes foram observadas nos casos de carcinosarcoma, sendo estes dois tipos de carcinomas considerados altamente agressivos por vários autores<sup>73,84,93,94</sup>. Já o carcinoma micropapilar que se manifestou em alguns casos sob a forma de nódulos de tamanho pequeno a médio (T1-T2) e tempo de evolução considerado, na sua maioria intermediário, levou ao desenvolvimento metástase em muitas fêmeas deste estudo, provavelmente estas características do carcinoma micropapilar deve-se a perda de adesão evidente neste tipo de tumor, que sendo assim, mesmo em curto tempo e com tamanho reduzido permite a disseminação de células neoplásicas por vasos sanguíneos e linfáticos.

Os sarcomas mostraram-se, no presente estudo, como altamente capazes de disseminar-se pelo organismo. Sabe-se que nesse tipo de neoplasia as mitoses estão frequentemente presentes, e o comportamento biológico é sempre agressivo com metástase preferencialmente por via hemática<sup>26</sup>. Porém, observou-se claramente, neste trabalho, que as metástases de glândulas mamárias ocorreram, concomitantemente ou não, por via linfática, devido a sua localização no LS.

Todas as metástases distantes estavam localizadas preferencialmente nos pulmões, sendo que em apenas duas cadelas os nódulos também estavam presentes no fígado. Os achados reafirmam a ideia corrente, na literatura pertinente, de que o mecanismo preferencial de metástase distante das células neoplásicas de tumores de mama, é a invasão do tecido pulmonar, seguido de órgãos como fígado e baço<sup>85,95</sup>.



## 7. CONCLUSÕES

A comparação entre o diagnóstico citológico e histopatológico mostrou que a citologia é uma técnica confiável para determinação dos tipos celulares presentes nos tumores mamários de cadelas, possibilitando a determinação de malignidade nos diferentes tecidos envolvidos e permitindo direcionar de forma mais acertada o protocolo de tratamento a ser utilizado.

A maioria dos casos observados foram classificados como carcinomas simples e complexos verificando-se reduzido número de sarcomas. Sendo os carcinomas mais frequentemente identificados, o carcinoma complexo, sólido, carcinossarcoma e carcinoma anaplásico.

A maioria dos casos foram graduados histologicamente em Grau III, indicando a importância do diagnóstico precoce da enfermidade e a necessidade de conscientização dos proprietários, evitando que os animais cheguem ao veterinário com a doença já em estado avançado e, conseqüentemente com prognóstico desfavorável.

O corante azul de metileno a 1% foi eficaz na localização dos linfonodos no momento da cirurgia, facilitando a extirpação e identificando com precisão o LS de cada massa neoplásica.

Este estudo ainda demonstrou que a utilização de uma dose menor de corante azul de metileno a 1%, foi igualmente eficiente na identificação do LS, podendo assim promover redução no custo do tratamento e diminuir a possibilidade de reações indesejadas, as quais já foram observadas em mulheres.

A localização dos linfonodos sentinelas encontrou-se de acordo com o padrão determinado em animais hígidos. E a presença de metástase neste ou em órgãos distantes apresentou estreita relação com os tipos neoplásicos mais malignos, como carcinoma anaplásico, carcinossarcoma, e carcinoma micropapilar.

## REFERÊNCIAS

- 1.Serpell JA. Evidence for an association between pet behavior and owner attachment levels. *Applied Animal Behaviour Science*.47(1):49-60.
- 2.McNicholas J, Gilbey A, Rennie A, Ahmedzai S, Dono J-A, Ormerod E. Pet ownership and human health: a brief review of evidence and issues. *BMJ : British Medical Journal*. 2005 11/04/accepted;331(7527):1252-4. PubMed PMID: PMC1289326.
- 3.MINISTÉRIO DA SAÚDE. INCA-Secretaria de Atenção à Saúde. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Controle do câncer de Mama. In: Rio de Janeiro I, editor. *Revista Brasileira de Cancerologia*2004. p. 33.
- 4.Pinho SS, Carvalho S, Cabral J, Reis CA, Gartner F. Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis. *Transl Res*. 2012 Mar;159(3):165-72. PubMed PMID: 22340765. Epub 2012/02/22. eng.
- 5.Shafiee R, Javanbakht J, Atyabi N, Bahrami A, Kheradmand D, Safaei R, et al. Comparative value of clinical, cytological, and histopathological features in feline mammary gland tumors; an experimental model for the study of human breast cancer. *Diagn Pathol*. 2013;8:136. PubMed PMID: 23941603. Pubmed Central PMCID: Pmc3846645. Epub 2013/08/15. eng.
- 6.Shafiee R, Javanbakht J, Atyabi N, Kheradmand P, Kheradmand D, Bahrami A, et al. Diagnosis, classification and grading of canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: an Clinico-Cytohistrological study with environmental factors influencing public health and medicine. *Cancer Cell Int*. 2013 Aug 9;13(1):79. PubMed PMID: 23937693. Pubmed Central PMCID: Pmc3765114. Epub 2013/08/14. Eng.
- 7.Khanna C, Lindblad-Toh K, Vail D, London C, Bergman P, Barber L, et al. The dog as a cancer model. *Nat Biotech*. 2006 09//print;24(9):1065-6.
- 8.Perez Alenza MD, Pena L, del Castillo N, Nieto AI. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *J Small Anim Pract*. 2000 Jul;41(7):287-91. PubMed PMID: 10976622. Epub 2000/09/08. eng.
- 9.Lombardi P, Florio S, Pagnini U, Crispino A, Avallone L. Ovarian function suppression with a GnRH analogue: D-ser(But[t])[6]-Arzgly[10]-LHRH (Goserelin) in hormone dependent canine mammary cancer. *J Vet Pharmacol Ther*. 1999 Feb;22(1):56-61. PubMed PMID: 10211718. Epub 1999/04/22. eng.
- 10.Morris JS, Dobson JM, Bostock DE, O'Farrell E. Effect of ovariectomy in bitches with mammary neoplasms. *Vet Rec*. 1998 Jun 13;142(24):656-8. PubMed PMID: 9670443. Epub 1998/07/22. eng.
- 11.Cassali GD, Gobbi H, Malm C, Schmitt FC. Evaluation of accuracy of fine needle aspiration cytology for diagnosis of canine mammary tumours: comparative

features with human tumours. *Cytopathology*. 2007 Jun;18(3):191-6. PubMed PMID: 17573766. Epub 2007/06/19. eng.

12.Simon D, Schoenrock D, Nolte I, Baumgartner W, Barron R, Mischke R. Cytologic examination of fine-needle aspirates from mammary gland tumors in the dog: diagnostic accuracy with comparison to histopathology and association with postoperative outcome. *Vet Clin Pathol*. 2009 Dec;38(4):521-8. PubMed PMID: 19392751. Epub 2009/04/28. eng.

13.Gama A, Schmitt F. Cadherin cell adhesion system in canine mammary cancer: a review. *Vet Med Int*. 2012;2012:357187. PubMed PMID: 22973534. Pubmed Central PMCID: Pmc3432389. Epub 2012/09/14. eng.

14.Angelim JL CM. Linfonodo sentinela: perspectivas no diagnóstico de metástase no câncer de mama em cadelas: revisão. *Medicina Veterinária*. 2012;6(1):24-32.

15.Sleeckx N, Van Brantegem L, Van den Eynden G, Fransen E, Casteleyn C, Van Cruchten S, et al. Lymphangiogenesis in canine mammary tumours: a morphometric and prognostic study. *J Comp Pathol*. 2014 Feb-Apr;150(2-3):184-93. PubMed PMID: 24225342. Epub 2013/11/15. eng.

16.Szczubial M, Lopuszynski W. Prognostic value of regional lymph node status in canine mammary carcinomas. *Vet Comp Oncol*. 2011 Dec;9(4):296-303. PubMed PMID: 22077411. Epub 2011/11/15. eng.

17.Pereira CT, Rahal SC, de Carvalho Balieiro JC, Ribeiro AA. Lymphatic drainage on healthy and neoplastic mammary glands in female dogs: can it really be altered? *Anat Histol Embryol*. 2003 Oct;32(5):282-90. PubMed PMID: 12969028. Epub 2003/09/13. eng.

18.Patsikas MN, Karayannopoulou M, Kaldrymidoy E, Papazoglou LG, Papadopoulos PL, Tzegas SI, et al. The lymph drainage of the neoplastic mammary glands in the bitch: a lymphographic study. *Anat Histol Embryol*. 2006 Aug;35(4):228-34. PubMed PMID: 16836586. Epub 2006/07/14. eng.

19.Khatib EM PP, Lima AFKT, Repetti CSF, Franco RP, Hataka, A. . Uso do azul de metileno na identificação do linfonodo sentinela em cadelas com neoplasias mamárias. *Revista Veterinária e Zootecnia*. 2011;18(2):60-5.

20.Matos AJ, Faustino AM, Lopes C, Rutteman GR, Gartner F. Detection of lymph node micrometastases in malignant mammary tumours in dogs by cytokeratin immunostaining. *Vet Rec*. 2006 May 6;158(18):626-30. PubMed PMID: 16679481. Epub 2006/05/09. eng.

21.Omair M, Al-Azawi D, Mann GB. Sentinel node biopsy in breast cancer revisited. *Surgeon*. 2014 Feb 15. PubMed PMID: 24548701. Epub 2014/02/20. Eng.

22. Bofin AM, Lydersen S, Isaksen C, Hagmar BM. Interpretation of fine needle aspiration cytology of the breast: a comparison of cytological, frozen section, and final histological diagnoses. *Cytopathology*. 2004 Dec;15(6):297-304. PubMed PMID: 15606361. Epub 2004/12/21. eng.
23. Britton PD, Provenzano E, Barter S, Gaskarth M, Goud A, Moyle P, et al. Ultrasound guided percutaneous axillary lymph node core biopsy: How often is the sentinel lymph node being biopsied? *The Breast*. 2009 2//;18(1):13-6.
24. Curry JM, Grindle CR, Merton DA, Goldberg BB, Rosen D, Pribitkin EA. Lymphosonographic sentinel node biopsy of the supraglottis in a swine model. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008 Dec;139(6):798-804. PubMed PMID: 19041506. Epub 2008/12/02. eng.
25. Dalton LW, Pinder SE, Elston CE, Ellis IO, Page DL, Dupont WD, et al. Histologic Grading of Breast Cancer: Linkage of Patient Outcome with Level of Pathologist Agreement. *Mod Pathol*. 2000 //print;13(7):730-5.
26. Goldschmidt M, Pena L, Rasotto R, Zappulli V. Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet Pathol*. 2011 Jan;48(1):117-31. PubMed PMID: 21266722. Epub 2011/01/27. eng.
27. Sorensen KU, Kristiansen VM, Cofone MA, Shofer FS, Breen AM, Langeland M, et al. Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence\*. *Veterinary and Comparative Oncology*. 2009;7(3):162-72.
28. ZUCCARI DAPdC, SANTANA AE, ROCHA NS. Correlação entre a citologia aspirativa por agulha fina e a histologia no diagnóstico de tumores mamários de cadelas. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 2001;38:38-41.
29. König HE, Liebich HG, Bragulla H. *Veterinary Anatomy of Domestic Mammals: Textbook and Colour Atlas*: Wiley; 2009.
30. Tanis PJ, Nieweg OE, Valdes Olmos RA, Kroon BB. Anatomy and physiology of lymphatic drainage of the breast from the perspective of sentinel node biopsy. *J Am Coll Surg*. 2001 Mar;192(3):399-409. PubMed PMID: 11245383. Epub 2001/03/14. eng.
31. Wrobel KH, El Etreby M, Gunzel P. [Histochemical and histological studies on the mammary gland of the female beagle dog during different stages of reproduction (author's transl)]. *Acta Histochem*. 1974;51(1):61-78. PubMed PMID: 4376647. Epub 1974/01/01. Histochemische und histologische Untersuchungen an der Milchdrüse der Beagle-Hundin während verschiedener Funktionszustände. ger.

- 32.Chandra SA, Mark Cline J, Adler RR. Cyclic morphological changes in the beagle mammary gland. *Toxicol Pathol.* 2010 Oct;38(6):969-83. PubMed PMID: 20651098. Epub 2010/07/24. eng.
- 33.Illera JC, Perez-Alenza MD, Nieto A, Jimenez MA, Silvan G, Dunner S, et al. Steroids and receptors in canine mammary cancer. *Steroids.* 2006 Jul;71(7):541-8. PubMed PMID: 16631217. Epub 2006/04/25. eng.
- 34.Misdorp W. Tumors of the Mammary Gland. *Tumors in Domestic Animals: Iowa State Press;* 2008. p. 575-606.
- 35.Hellmen E, Bergstrom R, Holmberg L, Spangberg IB, Hansson K, Lindgren A. Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. *Vet Pathol.* 1993 Jan;30(1):20-7. PubMed PMID: 8442324. Epub 1993/01/01. eng.
- 36.Misdorp W. Canine mammary tumours: protective effect of late ovariectomy and stimulating effect of progestins. *Vet Q.* 1988 Jan;10(1):26-33. PubMed PMID: 3376408. Epub 1988/01/01. eng.
- 37.Schneider R. Comparison of age, sex, and incidence rates in human and canine breast cancer. *Cancer.* 1970 Aug;26(2):419-26. PubMed PMID: 5465470. Epub 1970/08/01. eng.
- 38.Priester WA, Mantel N. Occurrence of tumors in domestic animals. Data from 12 United States and Canadian colleges of veterinary medicine. *J Natl Cancer Inst.* 1971 Dec;47(6):1333-44. PubMed PMID: 5120412. Epub 1971/12/01. eng.
- 39.Sorenmo KU, Rasotto R, Zappulli V, Goldschmidt MH. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Vet Pathol.* 2011 Jan;48(1):85-97. PubMed PMID: 21147765. Epub 2010/12/15. eng.
- 40.Taylor GN, Shabestari L, Williams J, Mays CW, Angus W, McFarland S. Mammary neoplasia in a closed beagle colony. *Cancer Res.* 1976 Aug;36(8):2740-3. PubMed PMID: 1277183. Epub 1976/08/01. eng.
- 41.Michel E, Feldmann SK, Kowalewski MP, Bley CR, Boos A, Guscetti F, et al. Expression of prolactin receptors in normal canine mammary tissue, canine mammary adenomas and mammary adenocarcinomas. *BMC Vet Res.* 2012;8:72. PubMed PMID: 22647582. Pubmed Central PMCID: Pmc3488549. Epub 2012/06/01. eng.
- 42.Queiroga FL, Perez-Alenza MD, Silvan G, Pena L, Lopes C, Illera JC. Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005 Feb;94(1-3):181-7. PubMed PMID: 15862964. Epub 2005/05/03. eng.

43. Rutteman GR, Bevers MM, Misdorp W, Van den Brom WE. Anterior pituitary function in female dogs with mammary tumors: II. Prolactin. *Anticancer Res.* 1989 Jan-Feb;9(1):241-5. PubMed PMID: 2495756. Epub 1989/01/01. eng.
44. Dorn CR, Taylor DO, Schneider R, Hibbard HH, Klauber MR. Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *J Natl Cancer Inst.* 1968 Feb;40(2):307-18. PubMed PMID: 5694272. Epub 1968/02/01. eng.
45. Moulton JE, Rosenblatt LS, Goldman M. Mammary tumors in a colony of beagle dogs. *Vet Pathol.* 1986 Nov;23(6):741-9. PubMed PMID: 3811139. Epub 1986/11/01. eng.
46. Bearss JJ, Schulman FY, Carter D. Histologic, immunohistochemical, and clinical features of 27 mammary tumors in 18 male dogs. *Vet Pathol.* 2012 Jul;49(4):602-7. PubMed PMID: 21441113. Epub 2011/03/29. Eng.
47. Saba CF, Rogers KS, Newman SJ, Mauldin GE, Vail DM. Mammary gland tumors in male dogs. *J Vet Intern Med.* 2007 Sep-Oct;21(5):1056-9. PubMed PMID: 17939564. Epub 2007/10/18. Eng.
48. Egenvall A, Bonnett BN, Ohagen P, Olson P, Hedhammar A, von Euler H. Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Prev Vet Med.* 2005 Jun 10;69(1-2):109-27. PubMed PMID: 15899300. Epub 2005/05/19. eng.
49. Itoh T, Uchida K, Ishikawa K, Kushima K, Kushima E, Tamada H, et al. Clinicopathological survey of 101 canine mammary gland tumors: differences between small-breed dogs and others. *J Vet Med Sci.* 2005 Mar;67(3):345-7. PubMed PMID: 15805744. Epub 2005/04/05. Eng.
50. Vascellari M, Capello K, Carminato A, Zanardello C, Baioni E, Mutinelli F. Incidence of mammary tumors in the canine population living in the Veneto region (Northeastern Italy): Risk factors and similarities to human breast cancer. *Prev Vet Med.* 2016 Apr 1;126:183-9. PubMed PMID: 26948297. Epub 2016/03/08. eng.
51. OLIVEIRA FILHO JCK, G.D.; MASUDA, E.K.; MARQUES, B.M.F.P.P.; FIGHERA, R.A.; IRIGOYEN, L.F.; BARROS, C.S.L. . Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro. 2010;30(2):85-177.
52. Santos AA, Lopes CC, Ribeiro JR, Martins LR, Santos JC, Amorim IF, et al. Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. *BMC Vet Res.* 2013;9:1. PubMed PMID: 23289974. Pubmed Central PMCID: Pmc3542312. Epub 2013/01/08. eng.
53. Silva AEd, Serakides R, Cassali GD. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. *Ciência Rural.* 2004;34:625-33.

- 54.Klopfleisch R, von Euler H, Sarli G, Pinho SS, Gartner F, Gruber AD. Molecular carcinogenesis of canine mammary tumors: news from an old disease. *Vet Pathol.* 2011 Jan;48(1):98-116. PubMed PMID: 21149845. Epub 2010/12/15. Eng.
- 55.van Garderen E, Schalken JA. Morphogenic and tumorigenic potentials of the mammary growth hormone/growth hormone receptor system. *Mol Cell Endocrinol.* 2002 Nov 29;197(1-2):153-65. PubMed PMID: 12431808. Epub 2002/11/15. Eng.
- 56.Philibert JC, Snyder PW, Glickman N, Glickman LT, Knapp DW, Waters DJ. Influence of Host Factors on Survival in Dogs with Malignant Mammary Gland Tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine.* 2003;17(1):102-6.
- 57.Fonseca CS, Daleck CR. Neoplasias mamárias em cadelas: influência hormonal e efeitos da ovari-histerectomia como terapia adjuvante. *Ciência Rural.* 2000;30:731-5.
- 58.Farhat GN, Parimi N, Chlebowski RT, Manson JE, Anderson G, Huang AJ, et al. Sex hormone levels and risk of breast cancer with estrogen plus progestin. *J Natl Cancer Inst.* 2013 Oct 2;105(19):1496-503. PubMed PMID: 24041978. Pubmed Central PMCID: Pmc3787910. Epub 2013/09/18. eng.
- 59.Samavat H, Kurzer MS. Estrogen metabolism and breast cancer. *Cancer Lett.* 2014 Apr 28. PubMed PMID: 24784887. Epub 2014/05/03. Eng.
- 60.Perez Alenza MD, Pena L, Nieto AI, Castano M. Clinical and pathological prognostic factors in canine mammary tumors. *Ann Ist Super Sanita.* 1997;33(4):581-5. PubMed PMID: 9616968. Epub 1997/01/01. Eng.
- 61.Morrison WB. Paraneoplastic syndromes of the dog. *J Am Vet Med Assoc.* 1979 Sep 15;175(6):559-61. PubMed PMID: 117002. Epub 1979/09/15. Eng.
- 62.Eisenberg AJ, Hajdu SI, Wilhelmus J, Melamed MR, Kinne D. Preoperative aspiration cytology of breast tumors. *Acta Cytol.* 1986 Mar-Apr;30(2):135-46. PubMed PMID: 3008470. Epub 1986/03/01. eng.
- 63.Sorenmo K. Canine mammary gland tumors. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2003 May;33(3):573-96. PubMed PMID: 12852237. Epub 2003/07/11. eng.
- 64.Choi YD, Choi YH, Lee JH, Nam JH, Juhng SW, Choi C. Analysis of fine needle aspiration cytology of the breast: a review of 1,297 cases and correlation with histologic diagnoses. *Acta Cytol.* 2004 Nov-Dec;48(6):801-6. PubMed PMID: 15581165. Epub 2004/12/08. eng.
- 65.Raskin RE. CHAPTER 2 - General Categories of Cytologic Interpretation. *Canine and Feline Cytology (Second Edition).* Saint Louis: W.B. Saunders; 2010. p. 15-25.
- 66.Solano-Gallego L. CHAPTER 12 - Reproductive System A2 - Raskin, Rose E. In: Meyer DJ, editor. *Canine and Feline Cytology (Second Edition).* Saint Louis: W.B. Saunders; 2010. p. 274-308.

- 67.Cowell RL. Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat: Mosby Elsevier; 2008.
- 68.Raskin RE, Meyer DJ. Citologia de Cães e Gatos: Atlas Colorido e Guia de Interpretação: Elsevier Health Sciences Brazil; 2011.
- 69.de Graaf H, Willemse P, Ladde BE, Van den Bergen HA, Krebber M, Tjabbes T, et al. Evaluation of a cytological scoring system for predicting histological grade and disease-free survival in primary breast cancer. *Cytopathology*. 1994 Oct;5(5):294-300. PubMed PMID: 7819514. Epub 1994/10/01. eng.
- 70.Misdorp W, Pathology AFlo, Pathology ARo, Oncology WCCfWRoC. Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat: Armed Forces Institute of Pathology; 1999.
- 71.Gama A, Alves A, Schmitt FC. Clinicopathologic features of mammary invasive micropapillary carcinoma (IMC) in dogs. *Vet Pathol*. 2008 Jul;45(4):600-1. PubMed PMID: 18587110. Epub 2008/07/01. eng.
- 72.Elston EW, Ellis IO. Method for grading breast cancer. *J Clin Pathol*. 1993 Feb;46(2):189-90. PubMed PMID: 8459046. Pubmed Central PMCID: Pmc501162. Epub 1993/02/01. eng.
- 73.Dutra AP, Azevedo Júnior GM, Schmitt FC, Cassali GD. Assessment of cell proliferation and prognostic factors in canine mammary gland tumors. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2008;60:1403-12.
- 74.Karayannopoulou M, Kaldrymidou E, Constantinidis TC, Dessiris A. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. *J Comp Pathol*. 2005 Nov;133(4):246-52. PubMed PMID: 16202421. Epub 2005/10/06. eng.
- 75.Rasotto R, Zappulli V, Castagnaro M, Goldschmidt MH. A retrospective study of those histopathologic parameters predictive of invasion of the lymphatic system by canine mammary carcinomas. *Vet Pathol*. 2012 Mar;49(2):330-40. PubMed PMID: 21670194. Epub 2011/06/15. eng.
- 76.Zaidan Dagli ML. The search for suitable prognostic markers for canine mammary tumors: A promising outlook. *Vet J*. 2008 Jul;177(1):3-5. PubMed PMID: 18054505. Epub 2007/12/07. eng.
- 77.Cassali GD. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors *BJVP*. 2011;4(2):153-80.
- 78.Vail DM, Macewen EG. Spontaneously Occurring Tumors of Companion Animals as Models for Human Cancer. *Cancer Investigation*. 2000 2000/01/01;18(8):781-92.
- 79.Damasceno K, Bertagnolli A, Estrela-Lima A, Ribeiro L, Rabelo B, Campos C, et al. Versican expression in canine carcinomas in benign mixed tumours: is there



an association with clinical pathological factors, invasion and overall survival? BMC Vet Res. 2012;8(1):195. PubMed PMID: doi:10.1186/1746-6148-8-195.

80.Damasceno KA, Bertagnolli AC, Estrela-Lima A, Rabelo BS, Campos LC, Ribeiro LG, et al. Versican expression in myoepithelial cells from carcinomas in canine mixed mammary tumors. Vet J. 2014 Apr;200(1):146-51. PubMed PMID: 24582132. Epub 2014/03/04. eng.

81.Kim JH, Im KS, Kim NH, Chon SK, Doster AR, Sur JH. Inflammatory mammary carcinoma with metastasis to the brain and distant organs in a spayed Shih Tzu dog. J Vet Diagn Invest. 2011 Sep;23(5):1079-82. PubMed PMID: 21908380. Epub 2011/09/13. eng.

82.Tavasoly A, Golshahi H, Rezaie A, Farhadi M. Classification and grading of canine malignant mammary tumors. Veterinary Research Forum : An International Quarterly Journal. 2013 Winter

83.Della Salda L, Sarli G, Benazzi C, Marcato PS. Giant cells in anaplastic mammary carcinoma of the dog and cat. J Comp Pathol. 1993 Nov;109(4):345-60. PubMed PMID: 8106667. Epub 1993/11/01. eng.

84.Dantas Cassali G, Cavalheiro Bertagnolli A, Ferreira E, Araujo Damasceno K, de Oliveira Gamba C, Bonolo de Campos C. Canine mammary mixed tumours: a review. Vet Med Int. 2012;2012:274608. PubMed PMID: 23193497. Pubmed Central PMCID: Pmc3485544. Epub 2012/11/30. eng.

85.Misdorp W, Cotchin E, Hampe JF, Jabara AG, von Sandersleben J. Canine Malignant Mammary Tumors. III. Special Types of Carcinomas, Malignant Mixed Tumors. Veterinary Pathology Online. 1973 May 1, 1973;10(3):241-56.

86.Elston CW, Ellis IO. 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. 1991 Nov;19(5):403-10. PubMed PMID: 1757079. Epub 1991/11/01. eng.

87.Sontas BH, Yuzbasioglu Ozturk G, Toydemir TF, Arun SS, Ekici H. Fine-needle aspiration biopsy of canine mammary gland tumours: a comparison between cytology and histopathology. Reprod Domest Anim. 2012 Feb;47(1):125-30. PubMed PMID: 21615802. Epub 2011/05/28. eng.

88.Campos MLCR, C.S.F.; Hataka, A.; Maiente, A.; Scorsato, P.S. . Pesquisa do linfonodo sentinela (LNS) através da administração de corante azul de metileno em cães portadores de neoplasias. Revista Nosso Clínico São Paulo. 2007;56(10):18-34.

89.Mathelin C, Croce S, Brasse D, Gairard B, Gharbi M, Andriamisandratoa N, et al. Methylene blue dye, an accurate dye for sentinel lymph node identification in early breast cancer. Anticancer Res. 2009 Oct;29(10):4119-25. PubMed PMID: 19846959. Epub 2009/10/23. eng.

- 90.Souza FWB, M.V.; De Nardi, A.B.; Huppes, R.R.; Quarterone, C.; Raposo, T.M.M; Kasper, P.N.; De Oliveira, M.T.; Guedes, R.L. . Linfadenectomia laparoscópica em cadela com neoplasia mamária. *Ciência Rural*, Santa Maria. 2013;43(4):1-4.
- 91.Zheng F, Barthel G, Collange O, Montemont C, Thornton SN, Longrois D, et al. Methylene blue and epinephrine: a synergetic association for anaphylactic shock treatment. *Crit Care Med*. 2013 Jan;41(1):195-204. PubMed PMID: 23222265. Epub 2012/12/12. eng.
- 92.Pinheiro LGP, Oliveira Filho RSd, Vasques PHD, Filgueira PHdO, Aragão DHP, Barbosa PME, et al. Hemosiderin: a new marker for sentinel lymph node identification. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2009;24:432-6.
- 93.Kurzman ID, Gilbertson SR. Prognostic factors in canine mammary tumors. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)*. 1986 Feb;1(1):25-32. PubMed PMID: 3507784. Epub 1986/02/01. eng.
- 94.Komazawa S, Sakai H, Itoh Y, Kawabe M, Murakami M, Mori T, et al. Canine tumor development and crude incidence of tumors by breed based on domestic dogs in Gifu prefecture. *J Vet Med Sci*. 2016 Sep 1;78(8):1269-75. PubMed PMID: 27150207. Pubmed Central PMCID: Pmc5053927. Epub 2016/05/07. Eng.
- 95.Adams WM, Dubeilzig R. Diffuse Pulmonary Alveolar Septal Metastases from Mammary Carcinoma in the Dog. *Veterinary Radiology*. 1978;19(5):161-7.