



Catarina de Moura Coelho - Avaliação da Utilidade da Imunohistoquímica na Detecção de Micrometástases Ocultas em Carcinomas Mamários em Gatos

CATARINA DE MOURA COELHO

**AVALIAÇÃO DA UTILIDADE DA
IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE
MICROMETÁSTASES OCULTAS EM
CARCINOMAS MAMÁRIOS EM GATOS**

Orientador: Professor Doutor Pedro Faísca

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2022

CATARINA DE MOURA COELHO

**AVALIAÇÃO DA UTILIDADE DA
IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE
MICROMETÁSTASES OCULTAS EM
CARCINOMAS MAMÁRIOS EM GATOS**

Dissertação defendida em provas públicas para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, no dia 4 de fevereiro de 2022, com o Despacho de Nomeação de Júri N° 13/2022, 24 de janeiro de 2022 com a seguinte composição:

Presidente: Prof. Doutor David Ramilo

Arguente: Prof.^a Doutor Adelina Gama

Orientador: Prof. Doutor Pedro Faísca

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2022

Catarina de Moura Coelho - Avaliação da Utilidade da Imunohistoquímica na Detecção de Micrometástases Ocultas em Carcinomas Mamários em Gatos

Agradecimentos

A todos os docentes e colaboradores da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias pelo profissionalismo, dedicação, exigência e transmissão de conhecimentos ao longo destes seis anos.

Ao meu orientador, Professor Doutor Pedro Faísca, pela disponibilidade e ajuda na realização desta dissertação de Mestrado.

A todos os docentes da cadeira de Anatomia Patológica III, a toda a equipa do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias e, por fim, ao Doutor José Catarino e à Inês Carvalho, por me terem recebido tão bem e pela partilha de conhecimentos.

À minha família por me ajudarem nesta etapa da minha vida.

À minha mãe por servir de exemplo e inspiração.

Aos meus amigos por me apoiarem.

Por fim, à minha Chôe, Hermés e Big, que me motivaram a seguir esta área.

Resumo

Os tumores mamários em gatos são a terceira neoplasia mais comum nesta espécie, sendo a maioria carcinomas mamários do tipo simples. A taxa de malignidade dos tumores mamários é de 85% sendo frequente a metastatização em linfonodos, pulmões, e menos frequentemente, fígado e pleura. Os linfonodos regionais apresentam um papel fundamental para o prognóstico do animal. Devido à elevada densidade celular dos linfonodos, por vezes, as micrometástases não são detetadas pelo método convencional de diagnóstico. A técnica de imunohistoquímica é muito utilizada em Medicina Humana e é, cada vez mais, utilizada como uma técnica de diagnóstico auxiliar em Medicina Veterinária.

Pretendeu-se com o presente estudo, avaliar a técnica de imunohistoquímica com os anticorpos AE1/AE3 na deteção de micrometástases ocultas em linfonodos regionais de cadeias mamárias previamente diagnosticados como negativos pelo método convencional de diagnóstico, em gatos com carcinomas mamários.

Este foi constituído por 100 casos de carcinomas mamários em gatos e por 125 linfonodos regionais. Através da técnica de imunohistoquímica, foram detetados 11% dos casos com metástases, em que 5% eram micrometástases ocultas.

Este estudo evidenciou a contribuição da técnica de imunohistoquímica na detecção de micrometástases ocultas em linfonodos regionais de gatos.

Palavras-chave: gatos; carcinoma mamário; imunohistoquímica; linfonodos; micrometástases

Abstract

Breast tumors in cats are the third most common neoplasm in this species, most being simple type mammary carcinomas. The malignancy rate of mammary tumors is 85%, and metastasization to lymph nodes, lungs, and less frequently, liver and pleura is frequent. Regional lymph nodes play a key role in the animal's prognosis. Due to the high cell density of the lymph nodes, sometimes micrometastases are not detected by the conventional diagnostic method. The immunohistochemistry technique is widely used in human medicine and is increasingly used as an auxiliary diagnostic technique in veterinary medicine.

This study aimed to evaluate the immunohistochemistry technique with the antibodies AE1/AE3 in the detection of occult micrometastases in regional lymph nodes of mammary chains previously diagnosed as negative by the conventional method of diagnosis, in cats with mammary carcinomas.

This consisted of 100 cases of mammary carcinomas in cats and 125 regional lymph nodes. Using the immunohistochemistry technique, 11% of the cases were found to have metastases, of which 5% were occult micrometastases.

This study showed the contribution of immunohistochemistry in the detection of occult micrometastases in regional lymph nodes of cats.

Key-words: cats; mammary carcinoma; immunohistochemistry; lymph nodes; micrometastases

Abreviaturas, siglas e símbolos:

AE1/AE3 - Anti-pan-citoqueratina 1/3

CTI - Células tumorais isoladas

DAB - Diaminobenzidina

FMV-ULHT - Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

HCl - Ácido clorídrico

HE - Hematoxilina-Eosina

OMS - Organização Mundial de Saúde

H₀ - Hipótese nula

H₁ - Hipótese alternativa

® - Marca registada

cm - Centímetros

µl - Micrólitros

µm - Micrómetros

ml -Mililitro

mm - Milímetros

% - Percentagem

Índice Geral:

Resumo.....	2
Índice de gráficos:.....	8
Índice de tabelas:	9
Índice de figuras:.....	10
I. Casuística do Estágio Curricular	11
1. Descrição da casuística do estágio curricular.....	11
1.1. Laboratório de histopatologia da FMV-ULHT.....	11
1.2. Aulas de Anatomia Patológica III da FMV-ULHT.....	13
1.3. Laboratório DNA tech-	13
1.4. Hospital Veterinário da FMV-ULHT.....	15
II. Introdução	17
1. Glândula mamária em gatos.....	17
1.1. Anatomia da glândula mamária em gatos	17
1.2. Irrigação sanguínea, enervação e drenagem linfática das glândulas mamárias em gatos	18
1.2.1. Irrigação sanguínea das glândulas mamárias em gatos.....	18
1.2.2. Enervação das glândulas mamárias em gatos	19
1.2.3. Drenagem linfática das glândulas mamárias em gatos	19
1.3. Histologia da glândula mamária em gatos	20
2. Linfonodo.....	21
2.1. Anatomia do linfonodo	21
2.2. Histologia do linfonodo	21
3. Prevalência de tumores mamários em gatos	22
4. Fatores de risco dos tumores mamários em gatos.....	23
4.1. Idade e raça.....	23
4.2. A realização da ovariectomia ou ovariectomia	24
4.3. Associação hormonal	24
5. Diagnóstico e prognóstico de neoplasias mamárias malignas em gatos	25
6. Sistema de classificação histológica dos tumores mamários em gatos.....	26
7. Classificação histológica - tipos de carcinomas mamários em gatos.....	27
8. Descrição histológica dos carcinomas mamários em gatos	27
8.1. Neoplasias epiteliais malignas:	27
8.1.1. Carcinoma mamário 'in situ':	27
8.1.2. Carcinomas mamários simples:	28

8.1.2.1. Carcinoma mamário simples do tipo tubular:	28
8.1.2.2. Carcinoma mamário simples do tipo tubulopapilar:	29
8.1.2.3. Carcinoma mamário micropapilar invasivo:	30
8.1.2.4. Carcinoma mamário sólido:	30
8.1.2.5. Comedocarcinoma mamário:	31
8.1.2.6. Carcinoma mamário anaplásico:	32
8.1.3. Carcinoma mamário associado a ductos	32
8.1.3.1. Carcinoma mamário ductal:	32
8.1.3.2. Carcinoma mamário papilar intraductal:	33
8.2. Neoplasias mamárias epiteliais malignas - tipos especiais	34
8.2.1. Carcinoma mamário adenoscamoso:	34
8.2.2. Carcinoma mamário mucinoso:	35
8.2.3. Carcinoma mamário rico em lípidos:	35
8.2.5. Carcinomas mamário de células fusiformes:	36
8.2.6. Carcinoma mamário inflamatório:	37
9. Sistema de graduação dos tumores mamários em gatos	37
10. Macrometástases, micrometástases e células tumorais isoladas	38
11. Imunohistoquímica	39
11.1. O princípio da imunohistoquímica	39
11.2. Imunohistoquímica como meio de detecção de micrometástases ocultas em linfonodos regionais	39
12. Objetivos	41
III. Materiais e métodos	42
1. Recolha de dados	42
1.1. Critérios de inclusão e exclusão	42
2. Metodologia utilizada	42
2.1. Protocolo da técnica de histopatologia com coloração HE	43
2.2. Protocolo da técnica de imunohistoquímica com os anticorpos de marcação epitelial AE1/AE3	43
2.3. Digitalização e visualização das lâminas	45
2.4. Classificação das metástases nos linfonodos regionais quanto ao seu diâmetro	45
3. Análise estatística	45
IV. Resultados	46
1. Análise descritiva	46
1.1. Idade, sexo e raça	46
1.2. Glândulas mamárias afetadas	46
1.3. Tipos histológicos de carcinomas mamários	46
1.4. Embolização linfática	47
1.5. Grau histológico dos carcinomas mamários	47
1.6. Distribuição dos linfonodos avaliados	47
1.7. Linfonodos metastizados e classificação das metástases	47
1.8. Gatos com linfonodos metastizados	48
2. Análise descritiva dos casos com linfonodos metastizados	51

2.1. Idade, sexo e raça.....	51
2.2. Glândulas mamárias afetadas.....	51
2.3. Tipos histológicos de carcinomas mamários.....	51
2.4. Embolização linfática.....	51
2.5. Grau histológico dos carcinomas mamários.....	52
2.6. Distribuição dos linfonodos metastizados.....	52
3. Avaliação da técnica de imunohistoquímica comparativamente à técnica de histopatologia com coloração HE.....	52
3.1. Valor preditivo positivo.....	52
3.2. Valor preditivo negativo.....	53
3.3. Sensibilidade.....	53
3.4. Especificidade.....	53
3.5. Valor global do teste.....	53
V. Discussão.....	54
1. Discussão dos casos:.....	54
1.1. Idade, sexo e raça:.....	54
1.2. Glândulas mamárias afetadas:.....	55
1.3. Tipos histológicos de carcinomas mamários:.....	55
1.4. Embolização linfática:.....	56
1.5. Grau histológico dos carcinomas mamários:.....	56
1.6. Distribuição dos linfonodos avaliados:.....	56
2. Casos com linfonodos metastizados:.....	57
2.1. Casos com linfonodos metastizados identificados através da técnica de imunohistoquímica:.....	57
2.2. Casos com linfonodos metastizados identificados por ambas as técnicas – Hipóteses:.....	58
2.3. Grau histológico dos carcinomas mamários:.....	58
3. Avaliação da técnica de imunohistoquímica comparativamente à técnica de histopatologia com coloração HE:.....	59
VI. Conclusão.....	60
VII. Referências Bibliográficas.....	61
VIII. Anexos.....	I

Índice de gráficos:

Gráfico 1. : Frequência das espécies em percentagem, enviadas para o laboratório da FMV-ULHT.....	12
Gráfico 2. : Divisão em percentagem dos diagnósticos histopatológicos mais frequentes realizados no laboratório de histopatologia da FMV-ULHT.....	13
Gráfico 3. : Representação em percentagem das espécies atendidas no Hospital da FMV-ULHT.....	15
Gráfico 4. : Divisão dos casos atendidos no Hospital da FMV-ULHT.....	16

Índice de tabelas:

Tabela 1.: Distribuição dos casos Ausentes de Metástases, com Macrometástases e com Micrometástases, e a sua correspondente distribuição de acordo com o Tipo Histológico, Grau, Embolização Linfática e Glândula Mamária. Original da autora.48

Índice de figuras:

Figura 1. - a., b. e c.: Fotografias de lâminas digitalizadas de linfonodos inguinais com micrometástases coradas através da técnica de imunohistoquímica AE1/AE3, objetiva (x10). Original da autora. **d:** Fotografia de lâmina digitalizada de linfonodo inguinal com micrometástase corada através da técnica de imunohistoquímica AE1/AE3, objetiva (x20). Original da autora.50

Figura 2. : Poster Científico de Medicina Veterinária selecionado para apresentação com o tema alvo da dissertação, tendo figurado nos dez primeiros lugares do Congresso Internacional Veterinário Montenegro. Original da autora.I

I. Casuística do Estágio Curricular

1. Descrição da casuística do estágio curricular

O estágio curricular está incluído no Mestrado Integrado em Medicina Veterinária.

Este estágio foi executado em quatro locais diferentes. Um deles foi no laboratório de histopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias (FMV-ULHT), com a duração de 6 meses, no período compreendido entre 21 de Setembro de 2020 e 22 de Março de 2021.

O estágio curricular também foi realizado na sala e laboratório de Anatomia patológica III da FMV-ULHT, com a duração de dois meses no período compreendido entre 21 de Setembro de 2020 e 30 de Novembro de 2020.

Este estágio também foi efetuado no hospital da FMV-ULHT, com a duração de dois meses no período compreendido entre 1 de Novembro de 2020 e 30 de Dezembro de 2020.

Por fim, este estágio foi realizado no laboratório DNA tech em Lisboa, onde foram elaboradas as técnicas de imunohistoquímica pertencentes à investigação realizada, no período compreendido entre 20 de Novembro de 2020 e 15 de Maio de 2021.

1.1. Laboratório de histopatologia da FMV-ULHT

As amostras retiradas cirurgicamente e biópsias recebidas no laboratório de histopatologia tinham como finalidade um diagnóstico histopatológico. O processamento destas amostras começou com a descrição das lesões macroscópicas e margens cirúrgicas da lesão em relação ao tecido normal. De seguida, a lesão seccionada foi colocada em cassetes devidamente identificadas que permaneceram em formol por 24 horas. Após esta fixação, as cassetes foram submetidas a um processo de parafinação. Posteriormente, as amostras foram colocadas em moldes de metal com a superfície do corte virada para baixo e preenchidas com parafina a 62°C e colocadas numa base fria para solidificarem. Estes blocos foram cortados no micrótomo e primeiramente foram desbastados com uma espessura de 10 a 12 micrómetros (μm). Foram realizados cortes com 2 a 3 μm de espessura. Os cortes foram colocados em água fria e colocados nas lâminas de vidro devidamente identificadas. De seguida foram colocados em água em banho maria a 50°C de forma a aderirem à lâmina de

vidro. Estas lâminas foram colocadas numa estufa a 62°C durante 1 hora. As mesmas foram submetidas a um processo de coloração.

A técnica de histopatologia com coloração HE iniciou-se com a colocação das lâminas no xilol por 15 minutos, permaneceram em outro recipiente com xilol por 5 minutos. De seguida fez-se 20 passagens em álcool 100%, 20 passagens em álcool 95%, 20 passagens em álcool 70% e ficaram a hidratar em água destilada 5 minutos. Posteriormente, ficaram a corar em Hematoxilina de Harris por 3,5 minutos e foram lavadas em água corrente. De seguida fez-se uma passagem de 3 segundos em ácido clorídrico (HCl) a 0,25% solução alcoólica e permaneceram a azular em água corrente durante 2 minutos. As lâminas permaneceram 1 minuto em álcool 70% e foram coradas com Eosina Y alcoólica durante 3 minutos. Posteriormente, fez-se 20 passagens em álcool 95%, 20 passagens em álcool 100%, permaneceram no xilol por 5 minutos e em outro xilol 15 minutos. Por fim, as lâminas foram montadas com cola e com lamelas de vidro.

Após estes procedimentos, foram visualizadas no microscópio óptico.

Foram recebidas 140 amostras no laboratório de histopatologia da FMV-ULHT.

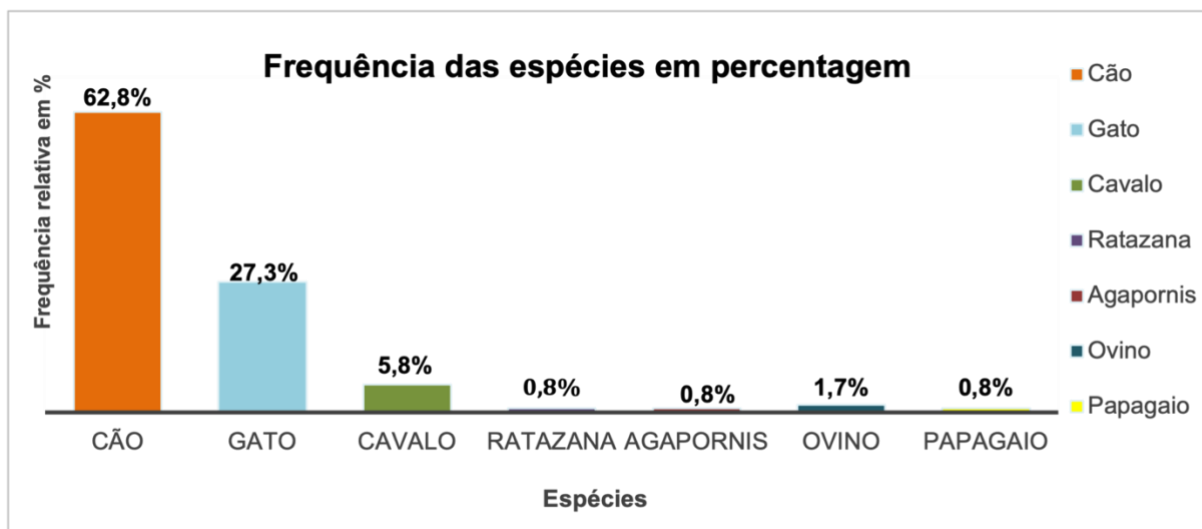


Gráfico 1. : Frequência das espécies em percentagem, enviadas para o laboratório da FMV-ULHT.

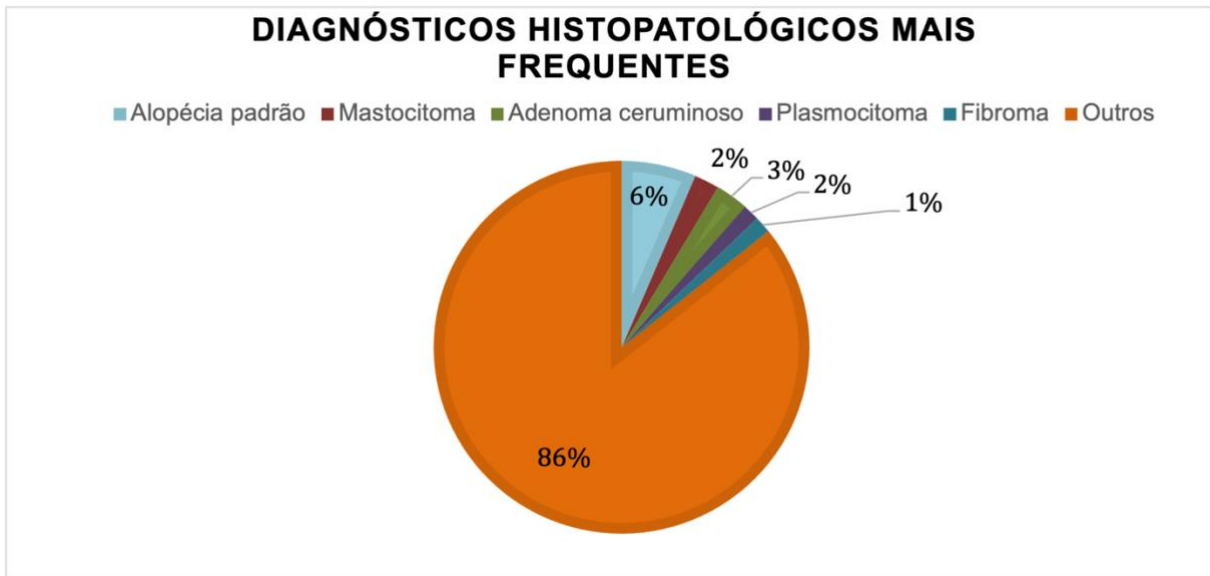


Gráfico 2. : Divisão em percentagem dos diagnósticos histopatológicos mais frequentes realizados no laboratório de histopatologia da FMV-ULHT.

1.2. Aulas de Anatomia Patológica III da FMV-ULHT

A disciplina da Anatomia Patológica III tem como princípio aplicar as bases dadas em Anatomia Patológica I e II. O objetivo desta disciplina era descrever lesões macroscópicas e microscópicas, e os seus respetivos diagnósticos. As aulas práticas desta disciplina foram dadas em laboratório e na sala de necrópsia. A maior parte dos animais recebidos eram cães e gatos. No entanto, foram realizadas necrópsias em coelhos, papagaios, porcos-da-Índia e animais silvestres. Os casos em que era necessário realizar relatório de necrópsia pedidos por um Médico Veterinário, eram enviadas amostras para o laboratório de histopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária. Em cada turno das aulas práticas de necrópsia, eram realizadas 6 necrópsias e no total houve 8 aulas. Foram realizadas 48 necrópsias nas aulas práticas de Anatomia Patológica III.

1.3. Laboratório DNAtch

Neste laboratório foram realizadas as técnicas de imunohistoquímica em linfonodos regionais desprovidos de metástases em casos de gatos com carcinomas mamários, previamente diagnosticados através da técnica de histopatologia com a coloração HE. Foram

realizadas 125 imunohistoquímicas neste laboratório. Sempre que eram realizadas imunohistoquímicas, havia uma lâmina de controlo positivo com um fragmento de pele.

O protocolo desta técnica foi descrito nos Materiais e Métodos.

1.4. Hospital Veterinário da FMV-ULHT

O estágio curricular neste hospital foi realizado na área de Medicina Interna, esta foi constituída por ecografias, radiografias, consultas gerais, consultas de especialidade, cirurgias e internamento, tanto em pequenos animais como em animais exóticos.

O estágio neste hospital abrangeu também a área laboratorial, onde foram realizados hemogramas, proteinogramas, esfregaços de sangue, urianálises e algumas citologias de efusões.

O cão e o gato foram as espécies mais atendidas neste hospital, com 46% e 40% da totalidade dos casos, respetivamente (**Gráfico 3.**).

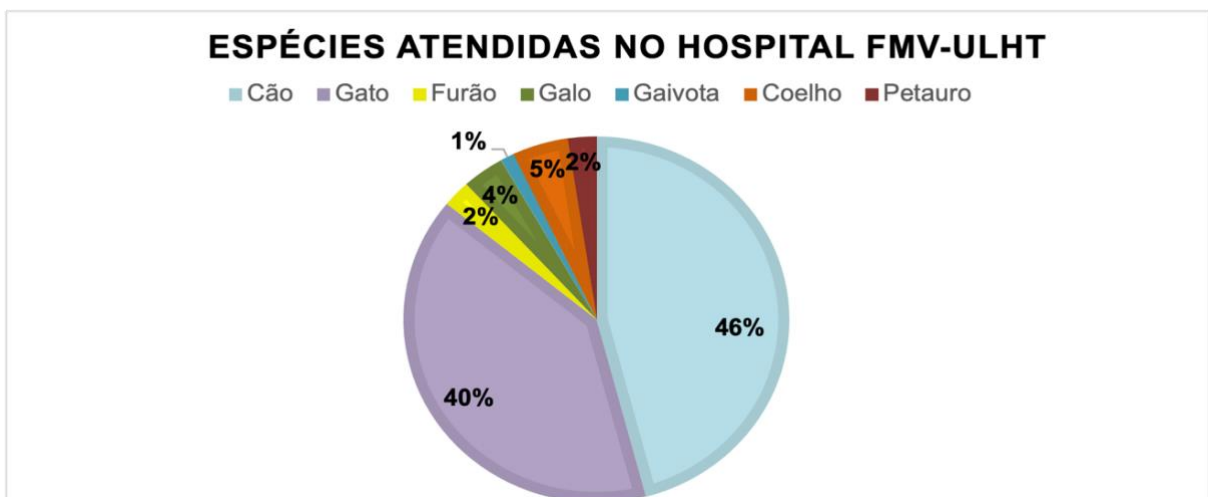


Gráfico 3. : Representação em percentagem das espécies atendidas no Hospital da FMV-ULHT.

No total foram atendidos 90 animais que se dividiram em consultas, internamento de doenças infecto-contagiosas e internamentos de cães e gatos. Todos os animais internado passaram previamente por uma consulta e foram também, realizadas análises de todos no laboratório (**Gráfico 4.**).

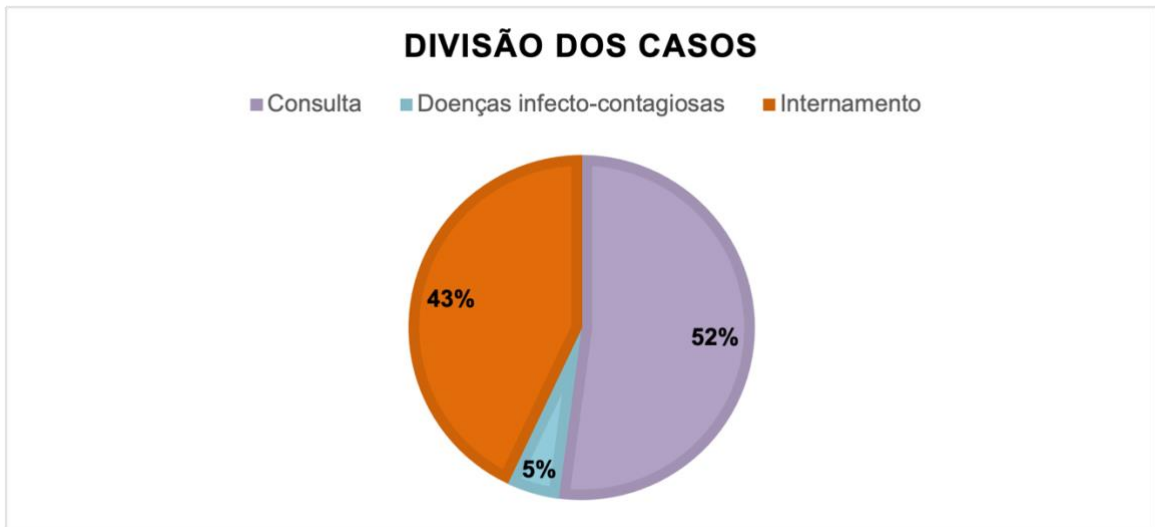


Gráfico 4. : Divisão dos casos atendidos no Hospital da FMV-ULHT.

II. Introdução

1. Glândula mamária em gatos

1.1. Anatomia da glândula mamária em gatos

As glândulas mamárias são glândulas apócrinas modificadas que existem unicamente em mamíferos. Têm por função nutrir e providenciar imunidade passiva ao recém-nascido. A glândula mamária é uma glândula ductal ramificada que está incrustada em tecido fibrovascular e abundante tecido adiposo. O sistema de ductos da glândula mamária começa com os ductos colectores ou papilares do mamilo e termina com alvéolos secretores quando esta está totalmente diferenciada. No nascimento, as glândulas mamárias dos mamíferos não estão desenvolvidas e o seu desenvolvimento tem início apenas durante a puberdade. Conforme vai decorrendo um novo ciclo de cio, vão surgindo alterações morfológicas na glândula mamária. No entanto, estas só ficam totalmente desenvolvidas durante a gravidez (Silver, 1966; Sorenmo *et al.*, 2011; Goldschmidt *et al.*, 2017).

Anatomicamente, as glândulas mamárias em gatos estão dispostas em duas cadeias mamárias que têm início no tórax ventral e que terminam na região abdominal ventral, separadas pela linha branca (Silver, 1966; Raharison & Sautet, 2006; Sorenmo *et al.*, 2011; Goldschmidt *et al.*, 2017).

As gatas apresentam quatro pares de glândulas mamárias, designando-se por axilares (M1), torácicas (M2), abdominais (M3) e inguinais (M4), sendo que existem gatas com uma quinta glândula mamária inguinal (Silver, 1966; Raharison & Sautet, 2006; Sorenmo *et al.*, 2011; Goldschmidt *et al.*, 2017).

Existe ainda outra nomenclatura para as glândulas mamárias, nomeadamente torácica cranial (T1), torácica caudal (T2), abdominal cranial (A1) e abdominal caudal (A2) (Raharison & Sautet, 2006; Goldschmidt *et al.*, 2017).

1.2. Irrigação sanguínea, enervação e drenagem linfática das glândulas mamárias em gatos

1.2.1. Irrigação sanguínea das glândulas mamárias em gatos

A circulação sanguínea e a drenagem linfática das glândulas mamárias são fundamentais para compreender o desenvolvimento de metástases tumorais (Silver, 1966; Crouch & Lackey, 1969; Hayden & Nielsen, 1971; Nickel *et al.*, 1986; Giménez *et al.*, 2010; Goldschmidt *et al.*, 2017).

As glândulas mamárias são altamente vascularizadas, e as veias mamárias são, por norma, mais extensas do que as artérias (Crouch & Lackey, 1969; Nickel *et al.*, 1986).

Nos gatos, as glândulas mamárias axilares (M1) e as glândulas mamárias torácicas (M2) são irrigadas pelos ramos perfurantes das artérias torácicas internas, intercostais e laterais (Silver, 1966; Crouch & Lackey, 1969; Nickel *et al.*, 1986). As glândulas mamárias abdominais (M3) são irrigadas pela artéria epigástrica superficial cranial e, por fim, a artéria epigástrica superficial caudal irriga as glândulas mamárias inguinais (M4) (Silver, 1966; Crouch & Lackey, 1969; Nickel *et al.*, 1986).

A irrigação venosa das glândulas mamárias torácicas é realizada através da veia torácica interna, da veia torácica lateral, da veia torácica superficial e das veias intercostais dorsais (Silver, 1966; Ogilvie, 1983). Por outro lado, as glândulas mamárias abdominais são irrigadas através da veia epigástrica cranial e da veia epigástrica superficial caudal (Silver, 1966; Ogilvie, 1983).

As veias que irrigam as glândulas mamárias dos gatos partilham o mesmo trajeto que as artérias, com exceção de algumas veias de dimensões mais reduzidas, que atravessam a linha média. Esta característica peculiar existente nas glândulas mamárias dos gatos permite uma disseminação metastática entre as glândulas mamárias emparelhadas, embora esta disseminação seja extremamente incomum (Silver, 1966; Crouch & Lackey, 1969; Hayden & Nielsen, 1971; Nickel *et al.*, 1986; Giménez *et al.*, 2010).

A irrigação venosa das glândulas mamárias torácicas realizada através da veia torácica interna e das veias intercostais, pode também permitir a metastização de um tumor para a cavidade torácica (Silver, 1966; Ogilvie, 1983).

1.2.2. Inervação das glândulas mamárias em gatos

A inervação das glândulas mamárias é realizada através dos ramos do nervo genito-femoral e dos nervos intercostais, que estão associados a artérias e arteríolas, e possivelmente são os nervos peptidérgicos que podem estar envolvidos na regulação do fluxo sanguíneo local. No mamilo, as fibras noradrenérgicas e péptidérgicas apresentam-se na derme em proximidade com os feixes musculares lisos, e podem estar relacionadas com o reflexo da descida do leite por via aferente. Não obstante, grande parte do parênquima secretório não apresenta qualquer tipo de inervação nem fibras nervosas peptidérgicas em torno dos alvéolos ou dos ductos (Pinho & Gulbenkian, 2007).

1.2.3. Drenagem linfática das glândulas mamárias em gatos

A drenagem linfática das glândulas mamárias distribui-se da seguinte forma: as glândulas mamárias axilares são drenadas pelos linfonodos axilares, as glândulas mamárias torácicas são drenadas pelos linfonodos axilares e pelos linfonodos inguinais superficiais e, por fim, as glândulas mamárias abdominais e inguinais são drenadas pelos linfonodos inguinais superficiais (Raharison & Sautet, 2006).

Nas glândulas mamárias dos gatos, a drenagem linfática de cada glândula mamária do mesmo lado pode interligar-se, mas não existe conexão linfática através da linha média (Deome *et al.*, 1959; Patsikas & Dessiris, 1996 a,b; Pereira *et al.*, 2003; Patsikas *et al.*, 2006; Raharison & Sautet, 2006; Raharison & Sautet, 2007; Papadopoulou *et al.*, 2009; Patsikas *et al.*, 2010).

Cerca de 1 a 3 dos linfonodos principais permitem que cada glândula mamária drene para o linfonodo superficial mais próximo de si. Porém, a drenagem linfática das glândulas mamárias pode ser alterada com a ocorrência de neoplasias, estas alterações já foram descritas por diversos autores (Deome *et al.*, 1959; Patsikas & Dessiris, 1996 a,b; Pereira *et al.*, 2003; Patsikas *et al.*, 2006; Raharison & Sautet, 2006; Raharison & Sautet, 2007; Papadopoulou *et al.*, 2009; Patsikas *et al.*, 2010).

Cada glândula mamária possui o seu próprio plexo linfático com anastomoses que rodeiam a base da mesma e que se estendem até ao parênquima com os outros plexos linfáticos (Deome *et al.*, 1959; Patsikas & Dessiris, 1996 a,b; Pereira *et al.*, 2003; Patsikas *et al.*, 2006; Raharison & Sautet, 2006; Raharison & Sautet, 2007; Papadopoulou *et al.*, 2009; Patsikas *et al.*, 2010).

Em gatas com carcinomas mamários, as alterações na drenagem linfática foram descritas como duas redes linfáticas separadas que se ligam às duas glândulas mamárias anteriores (axilar e torácica) e às duas glândulas mamárias posteriores (abdominal e inguinal) (Silver, 1966; Sorenmo *et al.*, 2011; Goldschmidt *et al.*, 2017).

1.3. Histologia da glândula mamária em gatos

A glândula mamária é uma unidade secretora composta por lóbulos glandulares mamários, separados entre si por septos de tecido adiposo e de tecido conjuntivo denso (Junqueira & Carneiro, 2004; Junqueira & Carneiro, 2013; Goldschmidt *et al.*, 2017). A secreção proveniente de cada lóbulo drena no ducto interlobular, seguindo para o ducto lactífero (Peleteiro, 1994). Quando os ductos lactíferos confluem, formam o seio lactífero (Peleteiro, 1994; Junqueira & Carneiro, 2004; Junqueira & Carneiro, 2013).

A glândula mamária é constituída por células mioepiteliais localizadas entre as células secretoras, a membrana basal e as fibras do estroma conjuntivo de suporte. As células mioepiteliais têm um papel crucial na expulsão do leite, sob influência de uma hormona, a oxitocina (Peleteiro, 1994).

A porção secretora, composta pelos ductos interlobulares, está rodeada por tecido conjuntivo laxo e por um plexo vascular (Weigelt *et al.*, 2005). Os ductos interlobulares são constituídos por epitélio cúbico simples, que varia em altura conforme o nível da atividade secretora e envolvidos por células mioepiteliais (Weigelt *et al.*, 2005; Peleteiro *et al.*, 2011; Junqueira & Carneiro, 2013). As células epiteliais dos ductos interlobulares têm um núcleo ovóide e apresentam uma localização basal, com pouca quantidade de citoplasma (Allison & Maddux, 2008). O revestimento dos ductos lactíferos é formado por uma dupla camada de células epiteliais cúbicas (Banks, 1993; Peleteiro, 1994; Solano- Gallego, 2010).

O tecido conjuntivo reticular serve de suporte para os alvéolos e para os ductos mais pequenos (Junqueira & Carneiro, 2013). Os ductos de maior calibre são suportados por fibras de músculo liso e fibras elásticas (Solano-Gallego, 2010).

2. Linfonodo

2.1. Anatomia do linfonodo

Os linfonodos são órgãos encapsulados constituídos por tecido linfoide, que percorrem sempre o trajeto dos vasos linfáticos. A forma dos linfonodos é semelhante a um rim e medem entre 1 milímetro (mm) a 2 centímetros (cm) de comprimento. Estes apresentam um lado convexo e um lado côncavo com uma reentrância chamada hilo, pela qual penetram as artérias e saem as veias. A circulação linfática destes órgãos é unidirecional, a linfa entra no linfonodo pelos vasos aferentes e sai através dos vasos eferentes (Junqueira & Carneiro, 2013).

Os linfonodos funcionam como um filtro que remove partículas estranhas antes que a linfa regresse ao sistema circulatório sanguíneo (Junqueira & Carneiro, 2013).

2.2. Histologia do linfonodo

Este órgão possui uma cápsula de tecido conjuntivo denso que envia trabéculas para o seu interior que dividem o parênquima em compartimentos incompletos (Junqueira & Carneiro, 2013).

O seu parênquima possui uma região cortical localizada abaixo da cápsula, assim como uma região medular que está localizada no centro do órgão. Entre estas duas regiões, existe a região paracortical ou cortical profunda. A região cortical superficial é constituída por tecido linfoide laxo, limitados pelos seios subcapsulares e peritrabeculares, e também por folículos linfóides. Estes últimos são compostos por condensações esféricas de linfócitos B, com alguns plasmócitos, macrófagos, células reticulares, células foliculares dendríticas e possuem centros germinativos. Os seios dos linfonodos são espaços irregulares delimitados por células endoteliais, células reticulares com fibras reticulares e macrófagos. Estes seios recebem a linfa proveniente dos vasos aferentes e encaminham-na para a medula. A região cortical profunda não possui folículos linfóides e é predominante em linfócitos T. Já a região medular é formada por cordões medulares predominantes em linfócitos B, fibras, células reticulares e macrófagos (Junqueira & Carneiro, 2013).

A separar os cordões medulares, encontram-se os seios medulares que recebem linfa que provém da zona cortical e comunicam com os vasos eferentes (Junqueira & Carneiro, 2013).

3. Prevalência de tumores mamários em gatos

Os tumores mamários em gatas ocorrem com muito maior frequência que os tumores mamários em gatos. Só cerca de 1 a 5 % dos tumores mamários em gatos são em machos (Hayes *et al.*, 1981; Weijer & Hart, 1983; Skorupski *et al.*, 2005; Goldschmidt *et al.*, 2017).

De acordo com alguns autores, os tumores mamários em gatos são a terceira neoplasia mais comum nesta espécie e correspondem a cerca de 12% a 17% do total de neoplasias em gatos domésticos, independentemente do sexo, logo a seguir aos tumores da pele e aos linfomas (Dorn *et al.*, 1968a,b; Hayes *et al.*, 1981; Carpenter *et al.*, 1987; Klopffleisch, 2016).

No entanto, em 2009, Vascellari e seus colegas concluíram que os tumores mamários em gatos são o segundo tumor mais frequente, correspondendo a 16% dos tumores nesta espécie, independentemente do sexo, sendo que em gatas corresponde a 25% da totalidade de tumores existentes nestas.

A prevalência pode variar quanto à localização geográfica, pois os tumores mamários em gatos estão muito relacionados com gatas não esterilizadas ou esterilizadas depois dos 6 meses de idade. Logo, esta prevalência é modificada consoante as práticas clínicas realizadas em cada país (Goldschmidt *et al.*, 2017).

Em Portugal, foi criado um sistema que nos permite identificar com mais precisão a prevalência de neoplasias em animais de companhia, o Vet-OncoNet. Este abrange todas as amostras enviadas para vários laboratórios nacionais especializados na área de Medicina Veterinária, tais como o DNATech, o VetPatLab (Análises Anatomopatológicas Veterinárias Lda.), a UTAD, o ICBAS e o Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa (Vet-OncoNet, 2020). De acordo com os dados adquiridos em 2019 e 2020 por este sistema, os tumores mamários epiteliais em gatos, como os carcinomas mamários em gatos, são a segunda neoplasia mais frequente nesta espécie. Dentro do grupo dos carcinomas mamários em gatos, o mais frequente é o carcinoma mamário tubular e o segundo mais frequente é o carcinoma mamário tubulopapilar (Vet-OncoNet, 2020).

O tumor mamário em gatos tem uma predisposição mais significativa a partir dos 9 anos de idade em gatas e é normalmente diagnosticado entre os 10 e os 12 anos de idade (Dorn *et al.*, 1968b; Hayden & Nielsen, 1971; Weyer *et al.*, 1972; Hayes & Mooney, 1985; Misdorp *et al.*, 1991; Kessler & Von Bomhard, 1997; Johnston *et al.*, 2001; Lana *et al.*, 2006; Kustritz, 2007).

A autora Peleteiro (1994) afirmou que em gatas, as glândulas mamárias mais afetadas são as glândulas mamárias torácicas. Todavia, é importante salientar que o risco de desenvolverem tumores mamários é igual em qualquer glândula mamária (Anderson & Jarrett, 1966; Hayden & Neilson, 1971; Hayes, 1977; Weijer & Hart, 1983; Lana *et al.*, 2006).

Os tumores mamários em gatos podem ser multicêntricos e por vezes afetar toda a cadeia mamária do mesmo lado (Peleteiro, 1994; Lana *et al.*, 2006).

O autor Misdorp, em 2002, afirmou ainda que é frequente existirem múltiplos tumores mamários em gatos e que, por vezes, podem ser de diferentes tipos histológicos.

Em gatas mais jovens é relativamente comum existirem lesões displásicas e alterações fibroepiteliais, tais como a hiperplasia ou a hipertrofia fibroepitelial e hipertrofia mamária (Goldschmidt *et al.*, 2017).

A maioria dos tumores mamários malignos nesta espécie são carcinomas mamários do tipo simples hormono-independentes que envolvem uma única componente de células neoplásicas, e estes correspondem a cerca de 80 a 90% da totalidade de tumores mamários em gatos (Nielsen, 1967; Hayden *et al.*, 1989; Misdorp *et al.*, 1999).

Os tumores mamários em gatos são de extrema importância por apresentarem uma taxa de malignidade bastante significativa (Hayes *et al.*, 1981; Bostock, 1986; Carpenter *et al.*, 1987; Moulton, 1990; Hahn & Adams, 1997; Rutteman *et al.*, 2001; Misdorp, 2002). Esta taxa corresponde a cerca de 85%, o que significa que estes tumores apresentam um comportamento biológico bastante agressivo (Hayes *et al.*, 1981; Bostock, 1986; Carpenter *et al.*, 1987; Rutteman *et al.*, 2001).

A taxa de metastização dos carcinomas mamários em gatos varia entre os 50% e os 90% (Misdorp *et al.*, 1999). Os locais de metastização de eleição dos carcinoma mamários em gatos são os linfonodos regionais e os pulmões, que em conjunto correspondem a cerca de 83% das metástases. Os outros locais de metastização são o fígado, a pleura, o diafragma, os rins e as glândulas adrenais (Hahn & Adams, 1977; Hahn *et al.*, 1994; Lana *et al.*, 2006).

4. Fatores de risco dos tumores mamários em gatos

Existem diversos fatores de risco que alteram a prevalência de tumores mamários em gatos, entre eles, a idade, a raça, se é realizada ou a idade em que é realizada a ovariectomia ou ovariectomia e a associação hormonal (Goldschmidt *et al.*, 2017).

4.1. Idade e raça

Como já foi mencionado anteriormente, a idade média de diagnóstico dos tumores mamários em gatas é dos 10 aos 12 anos (Dorn *et al.*, 1968b; Hayden & Nielsen, 1971; Weyer *et al.*, 1972; Hayes & Mooney, 1985; Misdorp *et al.*, 1991; Kessler & Von Bomhard, 1997; Johnston *et al.*, 2001; Lana *et al.*, 2006; Kustritz, 2007).

Quanto à raça dos gatos, a raça Siamesa e os Domésticos de Pêlo Curto apresentam maiores taxas de prevalência (Hayes *et al.*, 1981; Ito *et al.*, 1996).

A idade média de diagnóstico de tumores mamários em gatas siamesas é de 9 anos, sendo mais precoce do que nas restantes raças. Por este motivo, pensa-se que existe uma predisposição genética nesta raça (Hayes & Mooney, 1985; Ito *et al.*, 1996).

De acordo com um estudo retrospectivo realizado em 2009 com casos de tumores mamários, os gatos siameses têm um pior prognóstico comparativamente às restantes raças (Borrego *et al.*, 2009).

4.2. A realização da ovariectomia ou ovariectomia

Diversos estudos conseguiram demonstrar que a realização da ovariectomia ou ovariectomia precoce assume um papel fundamental na prevenção subsequente de neoplasias mamárias em gatas (Goldschmidt *et al.*, 2017).

A ovariectomia ou ovariectomia realizada numa idade mais jovem reduz significativamente a incidência de neoplasias mamárias em gatas. A prevalência de neoplasias mamárias em gatas que não fizeram este procedimento cirúrgico é 7 vezes mais elevada comparativamente a gatas esterilizadas antes do primeiro ano de idade. É importante ressaltar que o risco de desenvolver neoplasias mamárias aumenta conforme vai ocorrendo um novo cio. As gatas esterilizadas antes dos 6 meses de idade têm uma redução de 91% do risco de desenvolverem carcinomas mamários comparativamente a gatas inteiras. Não obstante, caso sejam esterilizadas antes de um ano de idade, ainda é bastante eficaz, pois há uma redução de 86% do risco de desenvolver estes tumores. Para gatas que realizam este procedimento cirúrgico após os dois anos de idade, não existe qualquer benefício. É importante salientar que não existem evidências de que as gatas que tenham sido mães, apresentem uma maior predisposição de desenvolver carcinomas mamários comparativamente a gatas inteiras que não estiveram gestantes (Misdorp, 1991; Overley *et al.*, 2005).

4.3. Associação hormonal

As hormonas apresentam um papel fundamental no desenvolvimento de tumores mamários em gatos inteiros e em gatas inteiras (Goldschmidt *et al.*, 2017).

A administração de hormonas exógenas, tais como progesterona e estrogénio, em gatas aumenta significativamente o risco de desenvolverem neoplasias mamárias. A sua administração pode aumentar o risco de desenvolverem estas neoplasias, comparativamente a gatas que não tomam esta medicação (Misdorp, 1991; Rutteman & Kirpensteijn, 2003; Lana *et al.*, 2006).

Existem estudos realizados em gatas que comprovaram que baixas doses de progesterona promovem o desenvolvimento de neoplasias mamárias benignas, enquanto que a combinação de progesteronas com estrogénios parece induzir o desenvolvimento de tumores mamários malignos (Misdorp, 1991; Rutteman & Kirpensteijn, 2003; Lana *et al.*, 2006).

Como já foi mencionado anteriormente, a maioria das gatas que surge com o histórico de administração de progesterona, possui lesões maioritariamente displásicas (alteração fibroadenomatosa mamária). Estas aparecem em várias glândulas mamárias, contudo, as lesões podem apresentar uma progressão maligna com a administração contínua de progesterona (Goldschmidt *et al.*, 2017).

5. Diagnóstico e prognóstico de neoplasias mamárias malignas em gatos

Os tumores mamários em gatos não são tão frequentes como os tumores mamários em cães, mas, a taxa de malignidade dos tumores mamários em gatos é mais elevada (Goldschmidt *et al.*, 2017). Por esta razão, a sua classificação e estadiamento são bastante relevantes a nível clínico (Goldschmidt *et al.*, 2017).

Sinais clínicos como, o rápido crescimento, o tamanho do tumor, a ulceração e a fixação à pele e ou a tecidos subjacentes podem ajudar a perceber a gravidade de uma neoplasia, ainda assim, é impossível diferenciar clinicamente entre tumores mamários benignos e malignos (Goldschmidt *et al.*, 2017).

Normalmente, o primeiro exame realizado é a punção aspirativa por agulha fina do tumor (um diagnóstico citológico) para diferenciar entre tumores mamários benignos e malignos, no entanto, a sua diferenciação é difícil pela disposição celular na lâmina e, por este motivo, a sua exatidão é somente cerca de 20% (Goldschmidt *et al.*, 2017).

A histopatologia é o melhor método de diagnóstico, já que permite diferenciar o tipo de tumor e a sua taxa de malignidade, permitindo assim classificar o grau e prognóstico

(Goldschmidt *et al.*, 2017). O diagnóstico histopatológico de carcinomas mamários é mais ou menos consensual, mas, o tipo histológico é variável (Goldschmidt *et al.*, 2017).

O estadió clínico e o prognóstico de uma neoplasia maligna é obtido através do sistema TNM, proposto pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para mulheres. Este foi adaptado para animais, mais concretamente para cadelas. Este sistema tem em consideração a dimensão do tumor - T, a existência de metástases nos linfonodos regionais - N e, por fim, a apresentação de metástases distantes - M (Sorenmo *et al.*, 2013).

Um estudo realizado demonstrou uma forte correlação entre a dimensão do tumor, a presença de metástases em linfonodos regionais e a sobrevivência do animal diagnosticado com o tumor (Coletto, 2017, p.37-41).

6. Sistema de classificação histológica dos tumores mamários em gatos

A OMS publicou em 1999, uma classificação histológica adequada aos tumores mamários em gatos (Hampe & Misdorp, 1974; Misdorp *et al.*, 1999).

Nesta classificação, a maioria dos subtipos histológicos baseavam-se na classificação histológica dos tumores mamários em cães. Contudo, os tumores mamários em gatos são menos heterogêneos do que os tumores mamários em cães devido à rara proliferação de células mioepiteliais neoplásicas. Por este motivo, existem menos subtipos histológicos em gatos (Goldschmidt *et al.*, 2017; Zappulli *et al.*, 2019).

A classificação dos tumores mamários em gatos foi reformolada (Zappulli *et al.*, 2019). Algumas categorias foram atualizadas com base na nova classificação em cães e foram ainda incluídos novos subtipos histológicos em gatos (Della Salda *et al.*, 1993; Pérez-Alenza *et al.*, 2004; Kamstock *et al.*, 2005; Sarli *et al.*, 2006; Seixas *et al.*, 2007; Seixas *et al.*, 2008; Goldschmidt *et al.*, 2011; Millanta *et al.*, 2011; Zappulli *et al.*, 2013; Zappulli *et al.*, 2019).

7. Classificação histológica - tipos de carcinomas mamários em gatos

Existem diversos tipos de carcinomas mamários em gatos. Estes dividem-se em dois grupos, sendo eles, neoplasias epiteliais malignas e neoplasias epiteliais malignas especiais (Zappulli *et al.*, 2019).

As neoplasias epiteliais malignas abrangem 9 tipos de carcinomas mamários: o carcinoma '*in situ*', os carcinomas simples e os carcinomas associados a ductos (Zappulli *et al.*, 2019).

Os carcinomas mamários simples dividem-se ainda em tubular, tubulopapilar, sólido, micropapilar invasivo, comedocarcinoma e anaplásico (Zappulli *et al.*, 2019)

Os carcinomas associados a ductos dividem-se em carcinoma papilar intraductal e carcinoma ductal (Zappulli *et al.*, 2019).

As neoplasias epiteliais malignas do tipo especial abrangem 6 tipos de carcinomas, entre os quais, o carcinoma das células escamosas, o carcinoma adenoescamoso, o carcinoma mucinoso, o carcinoma rico em lípidos, o carcinoma de células fusiformes e o carcinoma inflamatório (Goldschmidt *et al.*, 2017) .

Os tipos de neoplasias mamárias malignas em gatos mais frequentes são os carcinomas mamários epiteliais do tipo simples, como os carcinomas mamários do tipo tubular, carcinomas mamários do tipo tubulopapilares, carcinomas mamários micropapilares invasivos, comedocarcinomas mamários, respetivamente. Menos comumente, o carcinoma mamário de células escamosas, o carcinoma mamário mucinoso, e o carcinoma mamário rico em lípidos (Hayden *et al.*, 1989; Castagnaro *et al.*, 1998; Misdorp *et al.*, 1999; Perez-Alenza *et al.*, 2004; Kamstock *et al.*, 2005; Lana *et al.*, 2006; Sarli *et al.*, 2006; Seixas *et al.*, 2007; Matsuda *et al.*, 2008; Seixas *et al.*, 2008; Rasotto *et al.*, 2010).

8. Descrição histológica dos carcinomas mamários em gatos

8.1. Neoplasias epiteliais malignas:

8.1.1. Carcinoma mamário '*in situ*':

O carcinoma mamário '*in situ*' é uma neoplasia mamária epitelial maligna que não apresenta invasão da membrana basal pré-existente (Zappulli *et al.*, 2019).

Este tecido neoplásico é definido como nódulos bem demarcados, não-infiltrativos, que não se estendem até ao tecido mamário circundante. O tecido neoplásico deste carcinoma apresenta uma grande densidade celular com células bem compactadas dispostas em túbulos irregulares, ninhos e cordas. Estas células podem apresentar diversas formas, nomeadamente poligonais, redondas e cubóides. Simultaneamente, apresentam normalmente pouca quantidade de citoplasma eosinofílico e uma elevada relação entre núcleo e citoplasma. Estes núcleos são centrais, redondos a ovais, hipercrómicos, com cromatina aglomerada e com um nucléolo central basófilo. A anisocariose e anisocitose deste carcinoma são moderadas a severas e a quantidade de mitoses é variável (Zappulli *et al.*, 2019).

Existe uma certa dificuldade em diferenciar a epitelióse atípica, a hiperplasia lobular com atípias graves e o carcinoma '*in situ*'. Estas alterações podem todas ser numa única glândula mamária e representam uma displasia contínua da neoplasia (Zappulli *et al.*, 2019).

Existem ainda carcinomas mamários '*in situ*' que podem apresentar áreas de proliferação celular neoplásica intra-ductal, derivada de um outro carcinoma localizado na glândula mamária (Zappulli *et al.*, 2019).

8.1.2. Carcinomas mamários simples:

8.1.2.1. Carcinoma mamário simples do tipo tubular:

O carcinoma mamário simples do tipo tubular é uma neoplasia mamária maligna epitelial que possui como característica principal a sua disposição celular em forma de estruturas tubulares. No entanto, o padrão tubular pode existir juntamente com padrões sólidos ou papilares. Os túbulos são revestidos por uma mono ou dupla camada celular (Zappulli *et al.*, 2019).

O pleomorfismo nuclear é diversificado e os núcleos podem ser hipocromáticos a hiperchromáticos com uma marginação da cromatina, eucromática ou hiperchromática. Os nucléolos podem apresentar diversos tamanhos e quantidades, múltiplos de pequenas dimensões ou únicos de grandes dimensões. Estas células apresentam normalmente um citoplasma com margens percetíveis (Zappulli *et al.*, 2019).

Relativamente à contagem mitótica, existem normalmente 6 por 2,37mm². Não obstante, podem existir casos com mais de 30 mitoses por 2,37mm², classificados com grau histológico III (Zappulli *et al.*, 2019).

O estroma intertubular, constituído por vasos e fibroblastos, em alguns casos, apresenta um infiltrado de macrófagos, plasmócitos e linfócitos. Podem existir casos que exibem proliferação miofibroblástica, como resposta do estroma, a uma infiltração neoplásica nos tecidos adjacentes. A infiltração da neoplasia concomitantemente com o aumento da atividade mitótica e a anisocariose, são características que permitem diferenciar o adenoma mamário do carcinoma mamário (Zappulli *et al.*, 2019).

Um estudo retrospectivo constituído por 45 casos de carcinomas mamários simples do tipo tubular em cães, concluiu que 25% eram de grau I, 62% de grau II e os restantes de grau III. Ainda concluíram que 60% dos carcinomas apresentavam invasão linfática e vascular e que 27% apresentavam metástases nos linfonodos regionais. O grau tumoral serviu de indicador de prognóstico. A invasão linfática e vascular, assim como a metastização dos linfonodos, eram mais comuns em tumores de segundo grau (71% e 31%, respetivamente) e terceiro grau (83% e 67%, respetivamente) (Rasotto *et al.*, 2012).

Porém, estes tumores em gatos apresentam um comportamento bilógico bastante agressivo e a maior parte das vezes são classificados com um grau histológico de III (Zappulli *et al.*, 2019).

8.1.2.2. Carcinoma mamário simples do tipo tubulopapilar:

O carcinoma mamário simples do tipo tubulopapilar é uma neoplasia maligna epitelial simples da glândula mamária, que difere do tipo tubular por apresentar estruturas papilares predominantes, em mais de 20% dos túbulos, que se estendem em lumina tubular. Estes carcinomas apresentam uma taxa de malignidade superior à dos carcinomas mamários simples do tipo tubular. As papilas são suportadas por um estroma de tecido conjuntivo fibrovascular com espessura reduzida. As características relativas ao resto desta neoplasia são idênticas às características descritas no carcinoma tubular (Zappulli *et al.*, 2019).

Em cães foi realizado um estudo retrospectivo com 28 casos de carcinomas mamários tubulopapilares. Deste conclui-se que menos de 4% dos casos eram de grau I. Assim como o facto da invasão linfática e vascular juntamente com a metastização dos linfonodos regionais eram mais comuns em tumores de grau II (90% e 78%, respetivamente) e grau III (83% e 67%, respetivamente) (Goldschmidt *et al.*, 2017).

8.1.2.3. Carcinoma mamário micropapilar invasivo:

O carcinoma micropapilar invasivo é uma neoplasia mamária epitelial maligna e está descrito tanto em gatas, como em gatos (Seixas *et al.*, 2007). Este tumor é pouco comum nos gatos, independentemente do sexo (Zappulli *et al.*, 2019).

Estes carcinomas têm como principal característica as suas áreas com padrão micropapilar (Zappulli *et al.*, 2019).

De forma a ser diagnosticado corretamente, cerca de 50% da neoplasia tem de apresentar este tipo de padrão (Zappulli *et al.*, 2019).

Nesta neoplasia, um ou mais nódulos presentes no tecido mamário apresentam este padrão com células neoplásicas intraductais que formam pequenos agregados irregulares intraluminosos e papilas de reduzidas dimensões sem suporte fibrovascular, rodeadas por espaços lacunares vazios. Quanto à morfologia das células, estas são pleomórficas, com formas que variam de cubóide a poligonal, com um citoplasma de variadas dimensões. A relação entre o núcleo e o citoplasma é elevada. Os núcleos são hipercrómicos com cromatina granular e apresentam uma forma oval com um grande nucléolo central. A anisocariose e a anisocitose deste tumor são severas, e apresentam um número de mitoses variável (Zappulli *et al.*, 2019).

Neste tumor é comum haver invasão vascular o que, conseqüentemente, apresenta uma taxa de metastização mais elevada (Zappulli *et al.*, 2019).

Um estudo retrospectivo realizado com 16 casos de carcinomas mamários invasivos micropapilares diagnosticados em cães, concluiu que todos os casos apresentavam metastização dos linfonodos regionais, porém, poucos apresentavam metástases distantes (Gamba *et al.*, 2013).

8.1.2.4. Carcinoma mamário sólido:

O carcinoma mamário sólido é uma neoplasia epitelial maligna das glândulas mamárias. As células neoplásicas deste tumor encontram-se dispostas em ninhos e ilhas sem lumina. Esta neoplasia é menos frequente que o carcinoma mamário simples do tipo tubular (Zappulli *et al.*, 2019).

Este tumor é composto por lóbulos de tamanho irregular suportados por um estroma fibrovascular. Apesar de o padrão predominante ser sólido, podem existir juntamente com padrões tubulares ou tubulopapilares. As células apresentam margens irregulares, a sua

forma varia entre poligonal a oval, e o citoplasma é escassamente demarcado. Os núcleos são redondos a ovais e hiperocrômicos com cromatina acentuadamente pontilhada e apresentam um único nucléolo central. A anisocariose e anisocitose são moderadas a severas, e número de mitoses é variável (Zappulli *et al.*, 2019).

Relativamente à infiltração de células neoplásicas, é frequente invadirem os vasos linfáticos mais na periferia do tumor o que leva a metastização dos linfonodos regionais (Zappulli *et al.*, 2019).

Estes tumores não podem pontuar 1 para a formação de túbulos no sistema de classificação. Os carcinomas sólidos tendem a ser de grau II ou III (Zappulli *et al.*, 2019).

Foi realizado um estudo retrospectivo com 31 casos de carcinomas mamários sólidos diagnosticados em cães e em nenhum destes casos foi diagnosticado um tumor de grau I (Rasotto *et al.*, 2012). Os carcinomas de grau II correspondiam a 32% e os de grau III a 68%. Todos os tumores de grau III apresentavam metastização dos linfonodos regionais (Rasotto *et al.*, 2012).

8.1.2.5. Comedocarcinoma mamário:

O comedocarcinoma mamário é uma neoplasia epitelial maligna das glândulas mamárias, que normalmente apresenta grandes áreas de necrose. As áreas de necrose em neoplasias mamárias são frequentes, caso estas, apresentem um crescimento muito rápido. Devido a esta característica peculiar, existe perda de irrigação sanguínea, o que leva ao aparecimento de necrose localizada mais ao centro do tumor (Zappulli *et al.*, 2019).

Este tecido neoplásico apresenta múltiplas áreas de necrose celular de pequenas dimensões. A necrose celular tem uma coloração eosinofílica e, normalmente, apresenta detritos picnóticos, macrófagos, e outras células inflamatórias (Zappulli *et al.*, 2019).

Este tumor apresenta um padrão multi-nodular dentro de um único tumor. As células epiteliais periféricas às áreas de necrose podem apresentar diferentes padrões de crescimento, tais como, sólido, tubular, tubo-papilar e/ou micropapilar (Zappulli *et al.*, 2019).

A classificação deste tumor deve de ser realizada em áreas sem necrose. Esta neoplasia apresenta uma média de 20 mitoses por 2,37mm². A embolização linfática e a metastização dos linfonodos regionais é frequente (Zappulli *et al.*, 2019).

Por vezes, pode haver concomitantemente a esta neoplasia, uma mastite aguda ou subaguda e nestes casos é frequente existirem focos de infiltração de neutrófilos degenerados e não degenerados (Zappulli *et al.*, 2019).

8.1.2.6. Carcinoma mamário anaplásico:

O carcinoma mamário anaplásico é uma neoplasia mamária epitelial maligna que é extremamente rara em gatos (Della *et al.*, 1993). Este carcinoma mamário é o que apresenta a maior taxa de malignidade e a sua origem é de difícil percepção (Zappulli *et al.*, 2019). Este padrão pode coexistir com outros padrões. No entanto, por ser altamente maligno deve ser sempre incluído no diagnóstico (Zappulli *et al.*, 2019).

Este tumor apresenta uma invasão difusa de células neoplásicas no tecido conjuntivo interlobular e nos vasos linfáticos. As células neoplásicas podem estar dispostas em pequenos grupos ou podem estar isoladas. Estas células podem apresentar uma forma redonda, oval ou poligonal, com 15 a 70 µm de diâmetro. O citoplasma destas células pode ser abundante. Os núcleos são redondos a ovais, ocasionalmente indentados ou convoluídos com cromatina acentuadamente pontilhada. Por vezes, existem células multinucleadas com núcleos de tamanho irregular. Estas células são constituídas por 2 ou 3 nucléolos de tamanho variável. Estes tumores podem apresentar uma anisocariose e uma anisocitose acentuada com numerosas mitoses presentes. O aparecimento de canais microvasculares formados por células tumorais malignas, o chamado de mimetismo vasculogênico, é bastante frequente (Zappulli *et al.*, 2019).

As células neoplásicas invasivas provocam uma resposta desmoplásica no tecido mamário com proliferação de miofibroblastos. Esta alteração pode ser acompanhada de infiltrado de linfócitos, plasmócitos, mastócitos, neutrófilos, eosinófilos e macrófagos. O tecido intersticial é edematoso, com inúmeros vasos linfáticos (Zappulli *et al.*, 2019).

A maioria destes tumores são de grau III, no entanto, podem existir tumores de grau II. Estes são muito recorrentes e metastáticos (Zappulli *et al.*, 2019).

Foi realizado um estudo retrospectivo com 36 casos de carcinomas mamários anaplásicos diagnosticados em cães. Todos os casos eram de grau III e muitos deles com metastização nos linfonodos regionais (Rasotto *et al.*, 2012).

8.1.3. Carcinoma mamário associado a ductos

8.1.3.1. Carcinoma mamário ductal:

O carcinoma mamário ductal é uma neoplasia epitelial maligna presente nas glândulas mamárias, semelhante ao adenoma mamário ductal (Zappulli *et al.*, 2019).

Este carcinoma tem sido chamado de ‘carcinoma mamário complexo felino’ (Seixas *et al.*, 2008; Zappulli *et al.*, 2019). No carcinoma mamário ductal em gatos, existem células intersticiais mioepiteliais redondas a ovais sem matriz, em contrapartida, os tumores mamários complexos apresentam células intersticiais mioepiteliais fusiformes com uma matriz mixóide (Zappulli *et al.*, 2019).

As células desta neoplasia estão dispostas em cordas e túbulos com áreas sólidas. A lumina apresenta uma forma de fenda e está disposta em uma dupla camada, a primeira com uma componente luminal de células epiteliais e a segunda com uma camada de células mioepiteliais. As células epiteliais luminais são cubóides a poligonais, com núcleos hipercromáticos, escasso citoplasma e com elevada relação núcleo:citoplasma. As células mioepiteliais são redondas a ovais com pouca ou nenhuma matriz (Zappulli *et al.*, 2019).

As principais características que diferenciam os carcinomas ductais dos adenomas ductais, são: o facto dos carcinomas ductais apresentarem áreas sólidas maiores com perda de arquitetura ductal e possuírem ainda um grande número de mitoses (mais de 6 por 2,37mm²) com atipia celular, anisocitose e anisocariose moderada, com áreas focais ou multifocais de diferenciação escamosa (Zappulli *et al.*, 2019).

Os casos que foram diagnosticados com esta neoplasia, sobreviveram entre 1 a 2 anos após o diagnóstico (Zappulli *et al.*, 2013). Porém, não existe informação suficiente sobre o seu comportamento biológico (Zappulli *et al.*, 2019).

8.1.3.2. Carcinoma mamário papilar intraductal:

O carcinoma papilar intraductal é uma neoplasia mamária epitelial maligna que raramente é encontrada em gatos (Zappulli *et al.*, 2019).

É uma variante maligna do adenoma papilar intraductal. Este carcinoma mamário apresenta um padrão papilar mais irregular comparativamente ao adenoma mamário (Zappulli *et al.*, 2019).

Com a nova classificação histológica de tumores mamários em gatos, o carcinoma mamário papilar-quístico ficou incluído no carcinoma mamário papilar intraductal. Isto deve-se ao facto do aspeto papilar-quístico ser resultante da dilatação de um ducto (Zappulli *et al.*, 2019).

Esta neoplasia apresenta projeções papilares, suportadas por um estroma fibrovascular, que se estendem para o lúmen dos ductos. As papilas apresentam uma estratificação formada por células epiteliais luminais e células mioepiteliais supra basais. As células epiteliais luminais são pleomórficas com uma relação núcleo:citoplasma elevada e apresentam varias mitoses (mais ou igual a 6 por 2,37mm²). Estas células podem apresentar diferenciação escamosa e estarem dispostas individualmente ou em pequenos grupos. Pode existir formação de túbulos ou de um padrão sólido (Zappulli *et al.*, 2019).

Não existem informações suficientes à cerca do comportamento biológico destes tumores (Zappulli *et al.*, 2019). Não obstante, estes aparentam ser menos agressivos que os tumores mamários malignos não ductais (Zappulli *et al.*, 2019).

Existem poucos relatos desta neoplasia em gatos, contudo, os casos que foram diagnosticados continuaram vivos 1 a 2 anos após o diagnóstico. (Zappulli *et al.*, 2013).

8.2. Neoplasias mamárias epiteliais malignas - tipos especiais

8.2.1. Carcinoma mamário adenoscamoso:

O carcinoma mamário adenoscamoso é uma neoplasia epitelial maligna do tipo especial presente na glândula mamária, extremamente rara em gatos. Esta neoplasia apresenta áreas de qualquer tipo de carcinoma, geralmente com túbulos e/ou papilas, com áreas de diferenciação escamosa. Estas áreas multifocais de diferenciação escamosa apresentam características típicas de malignidade, que são encontradas no interior do carcinoma, e apresentam uma grande quantidade de mitoses (Zappulli *et al.*, 2019).

Não existem informações suficientes à cerca do comportamento bilógico desta neoplasia (Zappulli *et al.*, 2019).

8.2.2. Carcinoma mamário mucinoso:

O carcinoma mamário mucinoso é uma neoplasia mamária epitelial maligna do tipo especial pouco frequente em gatos (Zappulli *et al.*, 2019). A forma de identificar esta neoplasia é através da presença de uma matriz mucóide abundante que envolve as células epiteliais neoplásicas sem proliferação de células mioepiteliais (Sarli *et al.*, 2006; Zappulli *et al.*, 2019).

As células epiteliais luminárias produtoras de muco podem ser individuais ou podem estar dispostas em túbulos e ninhos, rodeadas por muco extracelular (Zappulli *et al.*, 2019).

O comportamento biológico desta neoplasia é ainda desconhecido (Zappulli *et al.*, 2019).

8.2.3. Carcinoma mamário rico em lípidos:

O carcinoma mamário rico em lípidos pertence ao grupo das neoplasias mamárias epiteliais malignas do tipo especial. Esta neoplasia é extremamente rara em gatos (Kamstock *et al.*, 2005; Zappulli *et al.*, 2019).

Este tumor apresenta uma ilha de células epiteliais luminárias neoplásicas divididas em lóbulos de tamanho variável por trabéculas fibrovasculares. As suas células neoplásicas são redondas a ovais e pouco delimitadas. O citoplasma destas células é abundante e contém numerosos vacúolos de pequenas dimensões ou apenas um de grandes dimensões que pode até empurrar o núcleo para a periferia da célula. Os núcleos são redondos a ovais, vesiculares, com bastante cromatina aglomerada e possuem 1 a 2 nucléolos. Estas neoplasias apresentam uma anisocariose e anisocitose marcada, e possuem ainda algumas mitoses. O seu comportamento biológico é desconhecido (Zappulli *et al.*, 2019).

Esta neoplasia apresenta mais de 50% de células neoplásicas com citoplasma vacuolizado (Zappulli *et al.*, 2019).

O uso da imunohistoquímica por vezes é utilizado para se distinguir carcinomas mamários ricos em lípidos de lipossarcomas. Os carcinomas mamários ricos em lípidos marcam positivo para as citoqueratinas e os lipossarcomas marcam negativo (Zappulli *et al.*, 2019).

8.2.4. Carcinomas mamário de células escamosas:

O carcinoma mamário de células escamosas pertence ao grupo das neoplasias mamárias epiteliais malignas do tipo especial e é muito pouco frequente em gatos (Zappulli *et al.*, 2019).

Esta é composta por epitélio escamoso maligno com origem em células escamosas ou células epiteliais ductais. Este tumor é histologicamente semelhante ao carcinoma de células escamosas da pele (Zappulli *et al.*, 2019).

O carcinoma mamário de células escamosas pode ser diferenciado do carcinoma mamário adenoscamoso por não possuir diferenciação glandular (Zappulli *et al.*, 2019).

Esta neoplasia mamária epitelial maligna do tipo especial possui ilhas e cordões de células epiteliais. As células e os núcleos são grandes, com extensa quantidade de citoplasma e podem apresentar pontes intercelulares. Estas células têm a peculiaridade de produzir pérolas de queratina. São frequentemente encontrados casos com um infiltrado inflamatório secundário à neoplasia (Zappulli *et al.*, 2019).

Esta infiltra-se localmente e pode metastizar para os linfonodos regionais (Zappulli *et al.*, 2019).

Esta não pode ser graduada com os sistemas atualmente disponíveis (Zappulli *et al.*, 2019).

8.2.5. Carcinomas mamário de células fusiformes:

O carcinoma mamário de células fusiformes é uma neoplasia mamária epitelial maligna do tipo especial e extremamente raro em gatos (Zappulli *et al.*, 2019).

A maioria destas neoplasias apresentam diferenciação escamosa, por este motivo, eram classificadas como carcinoma de células escamosas – variante de células fusiformes (Zappulli *et al.*, 2019).

Este carcinoma mamário possui ilhas e cordões formados por células epiteliais luminais, que fortuitamente, podem estarem associadas a túbulos (Zappulli *et al.*, 2019).

As células e os núcleos são grandes e fusiformes. Os núcleos possuem somente um nucléolo proeminente. Estas células neoplásicas apresentam alguma anisocariose e anisocitose, possuindo variadas mitoses (Zappulli *et al.*, 2019).

A imunohistoquímica é uma técnica de diagnóstico necessária para confirmar a sua origem epitelial. As células epiteliais marcam positivo para as citoqueratinas (Zappulli *et al.*, 2019).

8.2.6. Carcinoma mamário inflamatório:

O carcinoma mamário inflamatório pode apresentar edema subcutâneo, eritema e dor intensa no abdómen ventral (Zappulli *et al.*, 2019).

Este carcinoma pode ou não apresentar uma lesão nodular. Estas lesões nas glândulas mamárias devem de ser diferenciadas do angiossarcoma ventral abdominal. Na avaliação histopatológica é possível observar uma extensa embolização neoplásica (Zappulli *et al.*, 2019).

Juntamente com os carcinomas inflamatórios, os carcinomas mamários mais encontrados são os carcinomas mamários do tipo tubulopapilar e os carcinomas mamários papilares (Pérez-Alenza *et al.*, 2004; Millanta *et al.*, 2012).

9. Sistema de graduação dos tumores mamários em gatos

O sistema de graduação histológica 'Elston & Ellis' (1991), utilizado como meio de classificação dos tumores mamários em mulheres, foi revisto e adaptado para gatos (Castagnaro *et al.*, 1998). Este sistema consiste em avaliar as seguintes características morfológicas: a formação de túbulos, o pleomorfismo nuclear e por fim, a contagem mitótica (Castagnaro *et al.*, 1998). No entanto, foi publicado um segundo sistema de graduação adaptado para tumores mamários em gatos mais recente, que tem como princípio avaliar os seguintes critérios: a invasão linfática e vascular, a forma nuclear e a contagem mitótica (Mills *et al.*, 2015).

Este segundo sistema de graduação histológica baseia-se em características histológicas acima mencionadas que são pontuadas da seguinte maneira: a invasão linfática e vascular que pode ser ausente, pontuado como 0, ou presente, pontuado como 1. A seguinte característica é a forma nuclear, caso esteja menos de 5% anormal é pontuado como 0 e igual ou mais de 5% anormal é pontuado como 1. Por último, a contagem mitótica em 10 campos, caso haja menos ou igual a 62 mitoses é pontuado como 0 e mais de 62 mitoses é pontuado como 1 (Mills *et al.*, 2015).

No final, é realizada a soma dos pontos e caso o resultado seja 0 é classificado como grau I - baixo grau, 1 é classificado como grau II – grau intermédio e 2 ou 3 é classificado como grau III – grau elevado (Mills *et al.*, 2015).

10. Macrometástases, micrometástases e células tumorais isoladas

No cancro de mama em mulheres, o estado dos linfonodos é extremamente importante para o prognóstico (Ellis *et al.*, 2003).

Existem poucos estudos relativamente à avaliação dos linfonodos e à sua importância prognóstica em gatos com tumores mamários (Sorenmo *et al.*, 2013).

O processo de metastização e invasão dos tecidos por células neoplásicas inicia-se com a invasão da matriz extracelular, seguida da permeação de vasos linfáticos ou sanguíneos (Kusewitt & Rush, 2007). Posteriormente, ocorre a saída das células tumorais de dentro dos vasos e, por fim, a colonização destas células noutra local (Kusewitt & Rush, 2007).

Um estudo prospetivo, com uma amostra de 202 gatos com tumores mamários, afirmou que os gatos com linfonodos regionais metastizados apresentavam uma diminuição significativa na esperança média de vida comparativamente aos casos de tumores mamários sem metastização dos linfonodos regionais (Weijer & Hart, 1983).

Outro estudo retrospectivo realizado mais recentemente, com uma amostra de 92 gatos, veio confirmar a conclusão acima mencionada, relatando ainda que todos os gatos com metástases nos linfonodos regionais morreram nos primeiros 9 meses após o diagnóstico do tumor (Seixas *et al.*, 2011).

Existe uma classificação relativamente ao diâmetro das metástases (Boer *et al.*, 2010). De acordo com ‘*American Joint Committee on Cancer*’, estas dividem-se em macrometástases, micrometástases e células tumorais isoladas (CTI) (Amin *et al.*, 2016).

As macrometástases são caracterizadas como grupos de células neoplásicas com mais de 2 mm de diâmetro (Boer *et al.*, 2010; Amin *et al.*, 2016).

As micrometastases são definidas como grupos de células neoplásicas com dimensões compreendidas entre 0,2 e 2,0 mm de diâmetro (Boer *et al.*, 2010; Amin *et al.*, 2016).

Estas representam focos de disseminação de uma neoplasia maligna. Quando presentes num linfonodo, este é caracterizado como positivo para o crescimento de um tumor (Amezaga *et al.*, 2010; Boer *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2010; Tsiapali, 2011).

Existem ainda agregados de células neoplásicas de menores dimensões, com menos de 0,2 mm de diâmetro (Amin *et al.*, 2016). Estes são definidos como CTI e não são compreendidos como focos metastáticos. Um linfonodo com estes agregados celulares é caracterizado como livre de crescimento neoplásico (Boer *et al.*, 2010).

11. Imunohistoquímica

11.1. O princípio da imunohistoquímica

Quando os anticorpos possuem uma função altamente específica para uma determinada proteína / antígeno, são denominados de anticorpos monoclonais. A obtenção de anticorpos monoclonais contra as proteínas do organismo é resultante de um processo de isolamento prévio de células sanguíneas e de inoculações em cobaias, tais como ratos ou coelhos (Pinho, 2005; Clive *et al.*, 2010).

Quando são realizadas as imunohistoquímicas, estes anticorpos com alta especificidade são adicionados a um corte histológico, processados através do método convencional e fixados numa lâmina de vidro. Estes identificam-se e ligam-se às moléculas da proteína ou antígenos procurados (Pinho, 2005; Clive *et al.*, 2010).

Como o intuito é visualizar se houve ligação entre o anticorpo e o antígeno, e a sua localização, é necessário adicionar a este processo um corante com a capacidade de se ligar a estes, permitindo assim a sua visualização através de um microscópio ótico (Pinho, 2005; Clive *et al.*, 2010).

11.2. Imunohistoquímica como meio de deteção de micrometástases ocultas em linfonodos regionais

A técnica de imunohistoquímica é muito utilizada em Medicina Humana e é, cada vez mais, utilizada como uma técnica de diagnóstico auxiliar em Medicina Veterinária. Este facto deve-se à quantidade de anticorpos que apresentam reatividade cruzada entre antígenos de humanos e antígenos de animais (Teixeira *et al.*, 2011).

Como as metástases em linfonodos são um fator importante para a classificação do grau de malignidade e para a classificação do estadió clínico, é de extrema importância detetar micrometástases nos linfonodos (Freitas *et al.*, 2013; Coelho, 2014, p. 31-42).

Em relação ao seccionamento dos linfonodos, devem ser realizados secções seriadas com 2 mm de espessura, independentemente da existência de alterações macroscópicas, de forma a otimizar a deteção de metástases (Peña *et al.*, 2013).

Devido às reduzidas dimensões das micrometástases, estas, por diversas vezes, são impercetíveis em cortes realizados com a técnica de histopatologia com a coloração HE (Miyake *et al.*, 2001).

Este fenómeno deve-se à elevada densidade celular do parênquima linfoide (Miyake *et al.*, 2001).

Por este motivo, a deteção de micrometástases beneficiaria de um método de diagnóstico auxiliar que seja significativamente mais sensível que a histopatologia com coloração com HE, como é o caso das imunohistoquímicas (Miyake *et al.*, 2001; Hansen *et al.*, 2009; Amezaga *et al.*, 2010).

As vantagens das imunohistoquímicas, é que estas aumentam significativamente a sensibilidade relativamente à deteção de micrometástases e promovem um estadio clínico mais correto para o paciente (Höinghaus *et al.*, 2007; Freitas *et al.*, 2013).

Como os carcinomas mamários são de origem epitelial é necessário utilizar anticorpos que marquem o tecido epitelial, como é o caso do anticorpo AE1/AE3 (Matos *et al.*, 2006).

As citoqueratinas são proteínas presentes no epitélio das glândulas mamárias normais em cães, gatos e humanos (Sorenmo *et al.*, 2011).

Existem diversos estudos relativamente à deteção de micrometástases em linfonodos, pertencentes a cadelas com carcinomas mamários, através do uso da técnica de imunohistoquímica com os anticorpos AE1/AE3, que já comprovaram a sua eficácia e demonstraram ser benéficas para classificar o estadio clínico e fornecer um prognóstico mais fidedigno para o animal (Sorenmo *et al.*, 2013; Coelho, 2014, p.31-42; Coletto, 2017, p.43-45).

De acordo com um estudo realizado em cadelas com carcinomas mamários, onde realizaram a técnica de imunohistoquímica com os anticorpos AE1/AE3 como meio de diagnóstico de micrometástases em linfonodos das respetivas cadeias mamárias (Coelho, 2014, p.31-36). Detetando um aumento de 6 % de casos com micrometástases nos linfonodos. Estes linfonodos tinham sido diagnosticados como livres de metástases através do método convencional de diagnóstico. Esta investigação ainda evidenciou um paralelismo entre o grau histológico e a frequência de linfonodos regionais metastizados. O grau I apresentou 11% de linfonodos metastizados, o grau II apresentou 18% e o grau III apresentou 100% (Coelho, 2014, p.31-36).

Em suma, terá sido comprovado que a técnica de imunohistoquímica é um procedimento de diagnóstico de referência mais sensível que o método convencional, melhorando assim o estadiamento clínico destes animais (Coelho, 2014, p.31-42).

Outro estudo semelhante, realizado com 62 casos de cadelas diagnosticadas com carcinomas mamários e com 78 linfonodos regionais, em que foi utilizada a técnica de histopatologia com coloração HE e a técnica de imunohistoquímica com os anticorpos AE1/AE3 em linfonodos. Concluiu-se que através da técnica de histopatologia com coloração HE foram detetados 3% de linfonodos com CTI e 6% com macrometástases e micrometástases. E que através da técnica de imunohistoquímica foram detetados 35% de linfonodos com CTI e 9% com macrometástases e micrometástases, o que reforça que a técnica de imunohistoquímica é uma ferramenta importante para a deteção de CTI e de micrometástases em linfonodos (Coelho, 2017, p.37-41).

De acordo com um estudo realizado em linfonodos de cadelas, por Matos e os seus colegas (2006), a técnica de imunohistoquímica com os anticorpos AE1/AE3 identificou um aumento de 9% de micrometástases ocultas em linfonodos regionais, linfonodos estes, que tinham sido diagnosticados como livres de metástases pela técnica de histopatologia com coloração HE.

12. Objetivos

Este estudo tem como finalidade analisar o uso da técnica de imunohistoquímica em gatos e comprovar a sua eficácia na deteção de micrometástases ocultas em linfonodos.

O objetivo é averiguar se é importante para um diagnóstico e, conseqüentemente, um prognóstico mais acertado, comparativamente com o uso exclusivo da técnica de histopatologia com a coloração HE.

III. Materiais e métodos

1. Recolha de dados

O estudo foi efetuado na FMV-ULHT em Lisboa no Campo Grande, juntamente com o auxílio do Laboratório DNATech situado em Telheiras, Lisboa.

As amostras utilizadas nesta investigação foram enviadas pelo Laboratório DNATech. As amostras escolhidas são de carcinomas mamários em gatos num período compreendido entre dia 1 de Janeiro de 2019 a dia 31 de Dezembro de 2020.

1.1. Critérios de inclusão e exclusão

O critério de seleção das amostras prendeu-se com casos de carcinomas mamários em gatos previamente diagnosticados e classificados em grau através da técnica de histopatologia com a coloração HE pelo laboratório DNATech, com linfonodos regionais dados como livres de metástases.

Este estudo retrospectivo foi realizado com 100 casos de carcinomas mamários em gatos e 125 linfonodos regionais.

A divisão dos nódulos presentes nas glândulas mamárias foi realizada consoante a sua localização anatómica. Os nódulos presentes na glândula mamária M1 ou entre M1 e M2, teoricamente seriam drenados pelos linfonodos axilares e os nódulos presentes em M2, M3, M4 ou M5, pelos linfonodos inguinais. Oito dos casos não tinham informações referentes à glândula mamária afetada pelo carcinoma mamário.

Cerca de 25 casos apresentavam mais do que um linfonodo enviado.

2. Metodologia utilizada

Nesta investigação foram executadas duas técnicas para a deteção das metástases.

Foi realizada a técnica de histopatologia com coloração HE, o método convencional de diagnóstico, e a técnica de imunohistoquímica com os anticorpos AE1/AE3, a técnica que foi avaliada.

A maioria dos linfonodos estavam seccionados com cortes seriados a 1 mm de distância ao longo do maior eixo do linfonodo. No entanto, 25 linfonodos processados no início

de 2019 estavam seccionados apenas pelo maior eixo e foi necessário efectuar novas secções.

Cada bloco de parafina continha no mínimo 3 e no máximo 10 fragmentos do mesmo linfonodo, recortados novamente pelo maior eixo.

Para a coloração com HE, cada bloco de parafina foi seccionado com o microtomo a 2 µm e foram colocados dois cortes seriados na mesma lâmina. Para a técnica de imunohistoquímica, foi feito um corte em lâmina adesivada.

Ambos os cortes foram postos num recipiente com água fria e colocados nas lâminas de vidro devidamente identificadas com o auxílio de uma pinça de metal. De seguida, foram postos superficialmente em banho maria a 50°C para aderirem à lâmina de vidro.

Em todas as imunohistoquímicas realizadas, utilizou-se um controlo positivo para a marcação epitelial. O controlo positivo utilizado foi um fragmento de pele.

2.1. Protocolo da técnica de histopatologia com coloração HE

Após a colocação dos cortes dos linfonodos nas lâminas de vidro, estas foram para uma estufa a 60°C durante uma hora.

Procedeu-se então à colocação das lâminas no xilol por 15 minutos, depois permaneceram em outro recipiente com xilol por 5 minutos. Posteriormente, fez-se 20 passagens em álcool 100%, 20 passagens em álcool 95%, 20 passagens em álcool 70%. De seguida ficaram a hidratar em água destilada por 5 minutos. Após este processo, ficaram a corar em Hematoxilina de 'Harris' por 3 minutos e meio, lavou-se as lâminas em água corrente e fez-se uma passagem de 3 segundos em ácido clorídrico (HCl) a 0,25% solução alcoólica. Posteriormente, permaneceram a azular em água corrente durante 2 minutos. As lâminas ficaram mais 1 minuto em álcool 70% e foram coradas com Eosina Y alcoólica durante 3 minutos. Primeiramente, fez-se 20 passagens em álcool 95%, 20 passagens em álcool 100% e permaneceram no xilol por 5 minutos e noutra xilol por mais 15 minutos. Por fim, as lâminas foram montadas com lamelas de vidro.

Após estarem secas, foram visualizadas no microscópio ótico para confirmar se estavam livres de metástases.

2.2. Protocolo da técnica de imunohistoquímica com os anticorpos de marcação epitelial AE1/AE3

Após a colocação dos cortes nas lâminas de vidro adesivadas, estas foram colocadas na estufa a 37°C por cerca de 12 horas. Posteriormente, as mesmas passaram pelo processo de desparafinação. Permaneceram 15 minutos no xilol, de seguida 20 passagens em álcool 100%, 20 passagens em álcool 90%, 20 passagens em álcool 70% e, por último, foram passadas em água corrente por 1 minuto. De seguida, foram coladas numa estufa a 94°C com citrato pH 6 por 10 minutos para a recuperação antigénica. Foram arrefecidas à temperatura ambiente e colocadas em água para hidratar. Com a caneta hidrofóbica sublinhou-se as amostras de tecido na lâmina. Estas foram colocadas numa câmara humidificada e foi aplicado o '*Peroxidase Block*' da 'Cell Marque®' (peróxido de hidrogénio) por 10 minutos com a câmara fechada. Posteriormente, foram lavadas com água destilada. Foi aplicado o anticorpo primário AE1/AE3 da 'Cell Marque®' - 1:400 (anticorpo: diluente, µl) por 30 minutos com a câmara fechada. De seguida, foram lavadas com água destilada e lavadas 3 vezes com a solução tampão PBS 1.20., cada lavagem com a duração de 5 minutos e entre cada uma delas, as lâminas foram lavadas com água destilada.

Posteriormente, foi aplicado o '*amplifier - HiDef Detection*' da 'Cell Marque®' por 10 minutos e lavadas 3 vezes com o PBS 1.20, efetuadas como foi referido anteriormente. De seguida, foi aplicado o anticorpo secundário, o '*polymer - HiDef Detection*' da 'Cell Marque®', por 10 minutos e lavadas outra vez 3 vezes com PBS 1.20. Foi aplicado uma gota de DAB da 'Cell Marque®' diluída em 1 ml de diluente de DAB por cerca de 7 minutos. As lâminas foram escurridas para um papel com lixívia, para limpar melhor o produto cancerígeno, e lavadas em água corrente por 1 minuto. Foi aplicado o corante hematoxilina de '*Mayers*' por 1 minuto e foram lavadas com água destilada. Estas foram lavadas com PBS 1.20 por 1 minuto e com água destilada.

Procedeu-se à desidratação com 20 passagens em álcool 70%, 20 passagens em álcool 90%, 20 passagens em álcool 100% e por fim, 20 passagens no xilol. Para concluir este processo, as lâminas foram montadas com lamelas de vidro.

Após estarem secas, foram visualizadas no microscópio ótico para detetar a possível marcação de metastáses.

2.3. Digitalização e visualização das lâminas

As lâminas que apresentavam marcação e que tinham metástases na histopatologia com coloração HE, foram digitalizadas com 'NanoZoomer-SQ Digital slide scanner' (Hamamatsu Photonics). Foi efetuada a medição das metástases pelo seu eixo maior com o auxílio de uma régua, através deste mesmo programa.

2.4. Classificação das metástases nos linfonodos regionais quanto ao seu diâmetro

As metástases nos linfonodos, foram divididas consoante o seu diâmetro e classificadas de acordo com '*American Joint Committee on Cancer*' (Amin *et al.*, 2016).

As que apresentavam um diâmetro superior a 2 mm foram consideradas como macrometástases, as que apresentavam um diâmetro compreendido entre 0,2 mm a 2 mm foram consideradas como micrometástases e com diâmetro inferior a 0,2 mm foram consideradas como CTI (Amin *et al.*, 2016).

3. Análise estatística

Para a execução da análise foi utilizado o '*software R*', com os pacotes '*ggplot2*' para a visualização e '*dplyr*' para a produção de tabelas.

Em excepção à idade (variável contínua), as restantes variáveis foram analisadas por meio de tabelas de contingência. Para determinar a associação ou a independência destas variáveis entre si, e sempre que as categorias dessas variáveis tivessem representação relevante, foi utilizado o Teste Exacto de '*Fisher*', com o valor de rejeição de H_0 (Hipótese nula) de 0.05. Em relação à idade, realizou-se um teste não paramétrico, o Teste de '*Wilcoxon*', com o mesmo valor de rejeição de H_0 de 0.05.

Foi também calculada a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo, o valor preditivo negativo e o valor global do teste da técnica da imunohistoquímica comparativamente à técnica de histopatologia com coloração HE (o método '*gold-standart*').

IV. Resultados

1. Análise descritiva

1.1. Idade, sexo e raça

No total foram analisados 100 casos de carcinomas mamários em gatos e 125 linfonodos.

A média de idades obtida neste estudo foi de 11 anos (3 a 17 anos). Em relação ao sexo dos gatos havia apenas 1% (1/100) de machos e 99% (99/100) de fêmeas.

Quanto à distribuição dos casos por raça, a maior parte dos gatos eram Europeus Comuns, correspondentes a 90% (90/100). Os gatos Persa correspondiam a 5% (5/100), os gatos cruzados de Siamês correspondiam a 2% (2/100) e os gatos da raça Siamês, 'Sphynx' e Bosques da Noruega correspondiam cada um a 1% dos casos (1/100).

1.2. Glândulas mamárias afetadas

Em relação às glândulas mamárias afetadas, 13% (13/100) dos casos correspondiam a nódulos nas glândulas mamárias M1 ou entre M1 e M2, 78% (78/100) dos casos correspondiam a nódulos nas glândulas mamárias M2, M3, M4 ou M5 e 9% (9/100) eram casos sem informação (Tabela 1.).

1.3. Tipos histológicos de carcinomas mamários

Quanto aos tipos histológicos de carcinomas mamários presentes neste estudo, os carcinomas mamários simples tubulopapilares correspondiam a 49% dos casos (49/100), os carcinomas mamários simples sólidos a 20% (20/100), os carcinomas mamários simples tubulares a 18% (18/100), os carcinomas mamários papilares intraductais a 7% (7/100), os carcinomas mamários do tipo ductais a 2% (2/100), os comedocarcinomas a 2% (2/100) e os carcinomas mamários adenocarcinomas a 2% (2/100) (Tabela 1.).

1.4. Embolização linfática

Quanto aos casos com embolização linfática presente no tumor, 80% (80/100) destes não apresentavam embolização linfática, sendo que os restantes 20% (20/100) apresentavam esta condição. Somente, os carcinomas mamários de grau histológico 2 e 3, apresentavam embolização linfática (Tabela 1.).

1.5. Grau histológico dos carcinomas mamários

Em relação ao grau histológico dos carcinomas mamários, 26% (26/100) dos casos eram de grau 1, 56% (56/100) eram de grau 2 e 18% (18/100) dos casos eram de grau 3 (Tabela 1.).

1.6. Distribuição dos linfonodos avaliados

No que diz respeito aos linfonodos avaliados, 90% (113/125) eram linfonodos inguinais, 6% (8/125) eram linfonodos axilares e 3% (4/125) eram linfonodos não identificados.

Existiram 25 casos com mais de 1 linfonodo enviado e houve um caso que apresentava um linfonodo axilar e um linfonodo inguinal.

Não existiram casos com mais de um linfonodo metastizado.

1.7. Linfonodos metastizados e classificação das metástases

Através da técnica de imunohistoquímica com os anticorpos AE1/AE3 foram identificados 9% (11/125) de linfonodos metastizados.

Em relação à classificação das metástases presentes nos linfonodos metastizados consoante o diâmetro, 73% (8/11) eram micrometástases e 27% (3/11) eram macrometástases. Não houve um único caso em que tivessem sido detetadas somente células tumorais isoladas.

Referente aos linfonodos metastizados, 27% (3/11) tinham sido resecionados. Relativamente a este grupo de linfonodos 2 apresentavam micrometástases e 1 apresentava macrometástase.

Em 55% (6/11) dos linfonodos metastizados, foram identificadas metástases através de ambas as técnicas de diagnóstico, sendo que metade eram micrometástases e metade eram macrometástases.

Porém, 45% (5/11) dos linfonodos metastizados foram somente identificados através da técnica de imunohistoquímica com os anticorpos AE1/AE3. Estes linfonodos apresentaram micrometástases, sendo classificados como linfonodos com micrometástases ocultas (Figura 1.)

1.8. Gatos com linfonodos metastizados

O número de casos com linfonodos metastizados diagnosticados através da técnica de imunohistoquímica com os anticorpos AE1/AE3, foi de 11% (11/100) (Tabela 1.).

Tabela 1.: Distribuição dos casos Ausentes de Metástases, com Macrometástases e com Micrometástases, e a sua correspondente distribuição de acordo com o Tipo Histológico, Grau, Embolização Linfática e Glândula Mamária. Original da autora.

Variável	Carcinoma mamário-Tipo Histológico	Ausência de Metástases (n=89)	Macrometástases (n=3)	Micrometástases (n=8)
Carcinoma Mamário	Simple Tubular	16 (17.98)	0 (0)	2 (25)
	Simple Tubulopapilar	43 (48.31)	2 (66.67)	4 (50)
	Papilar Intraductal	7 (7.87)	0 (0)	0 (0)
	Ductal	2 (2.25)	0 (0)	0 (0)
	Sólido	17 (19.1)	1 (33.33)	2 (25)
	Comedocarcinoma	2 (2.25)	0 (0)	0 (0)

Catarina de Moura Coelho - Avaliação da Utilidade da Imunohistoquímica na Detecção de Micrometástases Ocultas em Carcinomas Mamários em Gatos

Variável	Carcinoma mamário-Tipo Histológico	Ausência de Metástases (n=89)	Macrometástases (n=3)	Micrometástases (n=8)
	Adenoscamoso	2 (2.25)	0 (0)	0 (0)
Grau	1	25 (28.09)	0 (0)	1 (12.5)
	2	47 (52.81)	3 (100)	6 (75)
	3	17 (19.1)	0 (0)	1 (12.5)
Embolização Linfática	Ausente	73 (82.02)	1 (33.33)	6 (75)
	Presente	16 (17.98)	2 (66.67)	2 (25)
Glândula Mamária	M1 e entre M1 e M2	12 (13.48)	1 (33.33)	0 (0)
	M2, M3, M4 e M5	69 (77.53)	2 (66.67)	7 (87.5)
	Sem informação	8 (8.99)	0 (0)	1 (12.5)

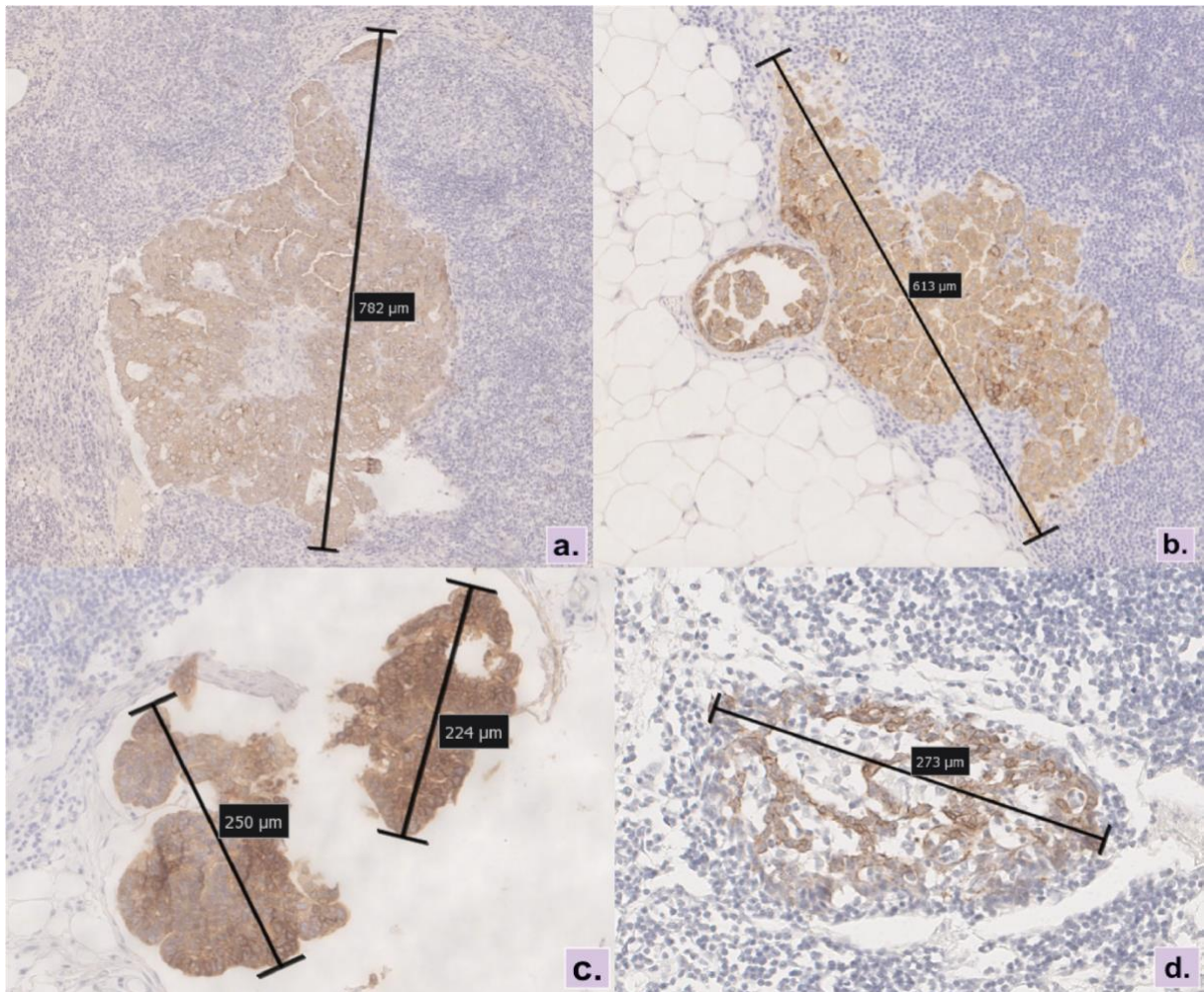


Figura 1. - a., b. e c.: Fotografias de lâminas digitalizadas de linfonodos inguinais com micrometástases coradas através da técnica de imunohistoquímica AE1/AE3, objetiva (x10). Original da autora. **d:** Fotografia de lâmina digitalizada de linfonodo inguinal com micrometástase corada através da técnica de imunohistoquímica AE1/AE3, objetiva (x20). Original da autora.

2. Análise descritiva dos casos com linfonodos metastizados

2.1. Idade, sexo e raça

A maior parte dos casos com linfonodos metastizados eram de fêmeas 91% (10/11) e apenas 9% (1/11) eram machos. Todos os casos com linfonodos metastizados pertenciam a gatos da raça Europeu Comum (11/11).

2.2. Glândulas mamárias afetadas

Cerca de 9% (1/11) dos casos positivos pertenciam ao grupo de nódulos nas glândulas mamárias M1 ou entre M1 e M2, 82% (9/11) dos casos positivos pertenciam ao grupo de nódulos nas glândulas mamárias M2, M3, M4 ou M5 e 9% (1/11) não apresentavam informação (Tabela 1.). Observa-se um número maior de casos positivos pertencentes a nódulos nas glândulas mamárias M2, M3, M4 ou M5.

2.3. Tipos histológicos de carcinomas mamários

Quanto ao tipo de carcinomas mamários pertencentes a casos com linfonodos metastizados, 55% (6/11) dos casos com linfonodos metastizados pertenciam a carcinomas mamários simples tubulopapilar, 27% (3/11) pertenciam a carcinomas mamários simples sólidos e 18% (2/11) pertenciam a carcinomas mamários simples tubulares (Tabela 1).

Em relação à análise estatística destas variáveis, devido à existência de muitas categorias com um número total de amostra reduzido, não se obteve qualquer resultado.

2.4. Embolização linfática

Referente à presença ou ausência de êmbolos linfáticos, 64% (7/11) dos casos com linfonodos metastizados não apresentavam embolização linfática e os restantes 36% (4/11) apresentavam embolização linfática (Tabela 1).

2.5. Grau histológico dos carcinomas mamários

Apenas 9% (1/11) dos casos com linfonodos metastizados eram micrometástases provenientes de carcinomas mamários de grau 1, 55% (6/11) eram micrometástases com origem em carcinomas mamários de grau 2 e 9% (1/11) eram micrometástases de carcinomas mamários de grau 3.

Cerca de 27% (3/11) dos casos com linfonodos metastizados eram macrometástases oriundas de carcinomas mamários de grau 2, não existindo casos com macrometástases em linfonodos de carcinomas mamários de graus 1 e 3.

2.6. Distribuição dos linfonodos metastizados

Apenas 18% (2/11) dos casos com linfonodos axilares metastizados provinham de nódulos nas glândulas mamárias M2, M3, M4 ou M5. Não houve um único caso de linfonodos axilares metastizados provenientes de nódulos nas glândulas mamárias M1 ou entre M1 e M2.

Cerca de 9% (1/11) dos casos com linfonodos inguinais metastizados provinham nódulos nas glândulas mamárias M1 ou entre M1 e M2. Paralelamente, 64% (7/11) dos casos com linfonodos inguinais metastizados estavam acompanhados de nódulos nas glândulas mamárias M2, M3, M4 ou M5. Um dos casos com linfonodo inguinal metastizado não apresentava informações à cerca da glândula mamária, o que corresponde a 9% (1/11).

3. Avaliação da técnica de imunohistoquímica comparativamente à técnica de histopatologia com coloração HE

3.1. Valor preditivo positivo

O valor preditivo positivo da técnica de imunohistoquímica em comparação à técnica de histopatologia com coloração HE foi de 55%. Isto é, a probabilidade da técnica de imunohistoquímica dar positiva quando o resultado é positivo, é de 55%.

3.2. Valor preditivo negativo

O valor preditivo negativo da técnica de imunohistoquímica relativamente à técnica de histopatologia com coloração HE foi de 100%. Logo, a probabilidade da técnica de imunohistoquímica dar negativa quando o resultado é negativo, é de 100%.

3.3. Sensibilidade

A sensibilidade da técnica de imunohistoquímica comparativamente à técnica de histopatologia com coloração HE foi de 100%. A capacidade da técnica de imunohistoquímica identificar como positivos, os casos realmente positivos, é de 100%.

3.4. Especificidade

A especificidade da técnica da imunohistoquímica relativamente à técnica de histopatologia com coloração HE foi de 95%. A capacidade de a técnica de imunohistoquímica identificar como negativos, os casos realmente negativos, é de 95%.

3.5. Valor global do teste

O valor global do teste da técnica de imunohistoquímica em relação à técnica de histopatologia com coloração HE foi de 95%. Sempre que o resultado der positivo ou negativo, a probabilidade de o resultado estar correto é de 95%.

V. Discussão

1. Discussão dos casos:

1.1. Idade, sexo e raça:

Este estudo foi realizado numa população de gatos que apresenta um viés, pois apenas foram escolhidos gatos com carcinomas mamários com linfonodos não metastizados no exame histopatológico, excluindo todos os outros, pelo que a interpretação dos resultados relativamente à sua população deve ser vista com cuidado.

Relativamente às idades dos gatos, a idade média (11 anos) obtida foi ao encontro do que é referido na literatura. O tumor mamário em gatos é normalmente diagnosticado entre os 10 e os 12 anos de idade. (Dorn *et al.*, 1968b; Hayden & Nielsen, 1971; Weyer *et al.*, 1972; Hayes & Mooney, 1985; Misdorp *et al.*, 1991; Kessler & von Bomhard, 1997; Johnston *et al.*, 2001; Lana *et al.*, 2006; Kustritz, 2007).

É defendido por diversos autores que os gatos de raça Siamesa têm uma idade média de diagnóstico de 9 anos, sendo mais precoce do que nas restantes raças. Por este motivo, pensa-se que existe uma predisposição genética nesta raça (Hayes & Mooney, 1985; Ito *et al.*, 1996). Porém, devido à reduzida percentagem de gatos com esta raça, não foi possível confirmar essa conclusão.

A respeito dos resultados obtidos no sexo dos gatos, existiu claramente uma maioria significativa de casos em gatas (99%) e apenas 1 caso em gatos, o que foi ao encontro do que está descrito na literatura. Os tumores mamários em gatas ocorrem com muito mais frequência que os tumores mamários em gatos e apenas cerca de 1 a 5 % dos tumores mamários em gatos são em machos (Hayes *et al.*, 1981; Weijer & Hart, 1983; Skorupski *et al.*, 2005; Goldschmidt *et al.*, 2017).

Quanto à raça, está descrito que gatos de raça Siamesa e os gatos Europeu Comum apresentam maiores taxas de prevalência (Hayes *et al.*, 1981; Ito *et al.*, 1996). A raça Europeu Comum terá sido a mais frequente com uma totalidade de 90% dos casos, tal como é descrito na literatura. Por outro lado, não foi possível efetuar uma conclusão válida referente a gatos de raça Siamesa, uma vez que existiu apenas 1 caso.

1.2. Glândulas mamárias afetadas:

A maior parte dos casos correspondiam a nódulos nas glândulas mamárias M2, M3, M4 ou M5. Uma possível explicação pode dever-se ao fato de apenas estarmos a incluir gatos aos quais foram extirpados tumores com o respetivo linfonodo. Sabendo que o linfonodo axilar é de mais difícil acesso e nem sempre é extirpado e que os nódulos em M1 normalmente metastizam para este linfonodo, estes nódulos podem estar subrepresentados nesta população.

Não obstante, o risco de desenvolvimento de tumores mamários em gatos é igual em qualquer glândula mamária (Anderson & Jarrett, 1966; Hayden & Neilson, 1971; Hayes, 1977; Weijer & Hart, 1983; Lana *et al.*, 2006).

1.3. Tipos histológicos de carcinomas mamários:

Em relação aos tipos de carcinomas mamários, o mais comum foi o carcinoma mamário do tipo simples tubulopapilar. De seguida o carcinoma mamário sólido e o carcinoma mamário do tipo simples tubular.

Estes resultados foram semelhantes ao que é afirmado na literatura. Diversos autores defendem que os tipos de neoplasias mamárias malignas em gatos mais frequentes são os carcinomas mamários epiteliais do tipo simples, como os carcinomas mamários do tipo tubular e os carcinomas mamários do tipo tubulopapilar. De seguida surgem, o carcinoma mamário micropapilar invasivo e o comedocarcinoma mamário. Com menor frequência registam-se, o carcinoma mamário de células escamosas, o carcinoma mamário mucinoso e o carcinoma mamário rico em lípidos (Hayden *et al.*, 1989; Castagnaro *et al.*, 1998; Misdorp *et al.*, 1999; Perez-Alenza *et al.*, 2004; Kamstock *et al.*, 2005; Lana *et al.*, 2006; Sarli *et al.*, 2006; Seixas *et al.*, 2007; Matsuda *et al.*, 2008; Seixas *et al.*, 2008; Rasotto *et al.*, 2010; Zappulli *et al.*, 2019).

Não houve um único caso de carcinoma mamário anaplásico e carcinoma mamário rico em lípidos, o que foi ao encontro do que é descrito na literatura, pois estes carcinomas mamários são extremamente raros em gatos (Della *et al.*, 1993; Kamstock *et al.*, 2005; Goldschmidt *et al.*, 2017; Zappulli *et al.*, 2019).

Outra possível explicação para não se encontrar nesta população carcinomas anaplásicos pode dever-se ao fato de serem por norma tumores muito agressivos e que

rapidamente metastizam e por isso terem sido à *priori* eliminados segundo os critérios de exclusão deste estudo.

1.4. Embolização linfática:

A maioria dos casos, 80% (80/100), não apresentava embolização linfática presente no tumor. No entanto, somente carcinomas mamários de grau histológico 2 e 3, apresentavam embolização linfática.

Apesar dos casos escolhidos apresentarem linfonodos não metastizados, 20% dos casos apresentavam embolização linfática no tumor. Estes casos, eventualmente, iriam apresentar metástases nos linfonodos regionais por possuírem células neoplásicas em circulação.

Como já foi referido anteriormente, os carcinomas mamários apresentam um comportamento biológico bastante agressivo e, geralmente, apresentam um grau histológico de II ou III (Zappulli *et al.*, 2008).

1.5. Grau histológico dos carcinomas mamários:

A maioria dos casos apresentavam carcinomas mamários de grau 2, que correspondiam a 56% (56/100).

A taxa de malignidade dos tumores mamários em gatos corresponde a cerca de 85%, o que significa que estes tumores apresentam um comportamento biológico bastante agressivo (Hayes *et al.*, 1981; Bostock, 1986; Carpenter *et al.*, 1987; Rutteman *et al.*, 2001).

No entanto, devido à pré-seleção dos casos não foi possível chegar a uma conclusão plausível, pois a maioria dos carcinomas com grau histológico III já tinham sido diagnosticados com linfonodos metastizados e, por este motivo, foram excluídos do estudo.

1.6. Distribuição dos linfonodos avaliados:

A maioria dos linfonodos analisados eram inguinais (90%). Como referido anteriormente, o linfonodo axilar é de mais difícil acesso e nem sempre é extirpado o que pode ter influenciado os resultados.

Segundo, De Araújo e seus colegas, em 2015, o baixo número de linfonodos axilares retirados cirurgicamente (6%) de cães, pode estar relacionado com a menor frequência de neoplasias mamárias torácicas.

Contudo, o risco de desenvolvimento de tumores mamários em gatos é igual em qualquer glândula mamária (Anderson & Jarrett, 1966; Hayden & Neilson, 1971; Hayes, 1977; Weijer & Hart, 1983; Lana et al., 2006).

2. Casos com linfonodos metastizados:

2.1. Casos com linfonodos metastizados identificados através da técnica de imunohistoquímica:

Através da técnica de imunohistoquímica com os anticorpos AE1/AE3, foram identificados 9% (11/125) de linfonodos metastizados, em que 73% (8/11) eram micrometástases e 27% (3/11) eram macrometástases. O número de casos diagnosticados com linfonodos metastizados através da técnica de imunohistoquímica com os anticorpos AE1 e AE3 foi de 11% (11/100).

No entanto, 45% (5/11) dos linfonodos metastizados foram apenas identificados através da técnica de imunohistoquímica. Sendo classificados como linfonodos com micrometástases ocultas. Ou seja, 5% (5/100) da totalidade dos casos foram diagnosticados com micrometástases ocultas através da técnica de imunohistoquímica.

De acordo com estudos realizados em cadelas com tumores mamários, onde foram utilizadas ambas as técnicas de diagnóstico de metástases em linfonodos regionais, detetou-se um aumento de 7% de casos com micrometástases em linfonodos. Estes linfonodos tinham sido diagnosticados como livres de metástases por meio da técnica de histopatologia com coloração HE (Coelho, 2014, p.31-42).

Outro estudo semelhante realizado com 78 linfonodos regionais de cadelas, em que se utilizaram as mesmas técnicas de diagnóstico de metástases em linfonodos concluiu que, através da técnica imunohistoquímica com os anticorpos AE1/AE3 houve um aumento de 3% de linfonodos com macrometástases e micrometástases (Coletto, 2017, p.37-41).

Um estudo idêntico aos anteriores também executado em linfonodos de cadelas, realizado por Matos e seus colegas (2006), detetou 9% de micrometástases ocultas em linfonodos regionais através da mesma técnica citada anteriormente.

Em suma, os resultados obtidos nestes três estudos vão ao encontro do que foi obtido no presente estudo, o que suporta a ideia de que a imunohistoquímica é uma técnica de diagnóstico fundamental na identificação de micrometástases em linfonodos regionais de tumores mamários.

2.2. Casos com linfonodos metastizados identificados por ambas as técnicas – Hipóteses:

Relativamente aos casos com linfonodos metastizados identificados por ambas as técnicas, existem algumas hipóteses que podem justificar este acontecimento. Uma delas é a possível ausência de metástases nos cortes efetuados anteriormente. Além desta, também existe a possibilidade de ter existido um erro associado ao diagnóstico vigente. Finalmente, surge também a hipótese das metástases identificadas nos linfonodos poderem ter criado uma baixa alteração morfológica nestes órgãos. Como estas foram marcadas através da imunohistoquímica, conseguimos identificar a sua localização e observar na lâmina de histopatologia com coloração HE.

As reduzidas dimensões das micrometástases podem explicar o resultado obtido. Este fenómeno deve-se à elevada densidade celular do parênquima linfóide (Miyake et al., 2001). Por esta razão, a deteção de micrometástases necessita de um método de diagnóstico auxiliar que seja significativamente mais sensível que a histopatologia com coloração com HE, como é o caso das imunohistoquímicas (Miyake et al., 2001; Hansen et al., 2009; Amezaga et al., 2010).

2.3. Grau histológico dos carcinomas mamários:

Os carcinomas mamários de grau 2 apresentaram uma maior percentagem de linfonodos metastizados 16% (9/56). Segundo o estudo realizado em cadelas por Coelho, em 2014, houve um paralelismo entre a graduação histológica e a frequência de metástases. Sendo que os carcinomas de grau 3 apresentaram 100% dos casos com metástases e o grau 2, somente 18%.

No entanto, não foi possível chegar a uma conclusão devido à pré-seleção realizada do presente estudo, pois foram retirados os casos diagnosticados com linfonodos metastizados.

3. Avaliação da técnica de imunohistoquímica comparativamente à técnica de histopatologia com coloração HE:

Tanto a sensibilidade como o valor preditivo negativo da técnica de imunohistoquímica comparativamente ao método convencional neste estudo foram de 100%. Um estudo semelhante apresentou um aumento de 7% de micrometástases ocultas através da técnica de imunohistoquímica, tendo revelado uma sensibilidade de 70% e um valor preditivo negativo de 93% (Coelho, 2014, 31-36).

Os valores calculados neste estudo foram semelhantes aos registados no estudo referido anteriormente.

Estes demonstraram a eficácia e a sensibilidade da técnica de imunohistoquímica com os anticorpos AE1/AE3 na identificação de metástases em linfonodos regionais.

Este estudo comprovou que a técnica de imunohistoquímica com os anticorpos AE1/AE3 é o método de diagnóstico mais sensível de micrometástases ocultas em linfonodos.

Devido ao carácter retrospectivo deste estudo, surgiram limitações, sendo uma delas a natureza dos gatos do estudo.

VI. Conclusão

A técnica de imunohistoquímica com os anticorpos AE1/AE3 demonstrou ser fundamental na pesquisa de micrometástases ocultas em linfonodos regionais de cadeias mamárias de gatos com carcinomas mamários.

Este estudo corroborou, a informação anteriormente referida, na medida em que demonstra que a técnica de imunohistoquímica com os anticorpos em estudo, é o método mais sensível de diagnóstico de micrometástases ocultas em linfonodos. A base deste estudo reforça a importância do diagnóstico e permite aperfeiçoar o estadiamento clínico e prognóstico de gatos com carcinomas mamários.

VII. Referências Bibliográficas

Allison, R. W. & Maddux, J. M. (2008). Subcutaneous Glandular Tissue: Mammary, Salivary, Thyroid, and Parathyroid. *In: R.L. Cowell, R.D. Tyler, J.H. Meinkoth & D.B. DeNicola (Eds.), Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat (3ªEd., pp. 112-119). St Louis, Missouri: Mosby Elsevier.*

Amezaga, R. U., Ortego, J. & Fuentes, J., Raventós, N., Parra, P., Uribarrena-Echevarría, R. (2010). Prognostic value of lymph node micrometastases in patients with colorectal cancer in Dukes stages A and B (T1-T4, N0, M0). *Rev Esp Enferm Dig*, 102(3), 176-186.

Amin, M. B., Edge, S. B., Greene, F. L., Byrd, D. R., Brookland, R. K., Washington, M. K.,..., Winchester, D. P. (2018). Breast. *In: AJCC Cancer Staging Manual (8ª Eds., pp. 221-240). New York, N.Y. Springer.*

Hortobagyi, G. N., Connolly, J. L., D'Orsi, C. J., Edge, S. B., Mittendorf, E. A., Rugo, H. S.,..., Giuliano, A. (2017). Breast. *In: AJCC Cancer Staging Manual (8ª Eds., pp. 589-636). Chicago, Illinois: The American College of Surgeons (ACS).*

Anderson, L. J. & Jarrett, W. F. (1966). Mammary neoplasia in the dog and cat. II. Clinicopathological aspects of mammary tumours in the dog and cat. *J Small Anim Pract*, 7, 697-701.

Banks, W. J. (1993). Tegumentary system. *In: W.J. Banks (Eds.), Applied veterinary histology (3ªEd., pp. 306-311). USA: Mosby.*

Boer, M., Dijck, J. A. A. M., Bult, P., Borm, G. F., & Tjan-Heijnen, V. C. G. (2010). Breast cancer: prognosis and occult lymph Node metastases, isolated tumor cells, and micrometastases. *J Natl Cancer Inst*, 102(6), 410-425.

Borrego, J. F., Cartagena, J. C., & Engel, J. (2009). Treatment of feline mammary tumours using chemotherapy, surgery and a COX-2 inhibitor drug (meloxicam): a retrospective study of 23 cases (2002-2007). *Vet Comp Oncol*, 7(4), 213-221.

Bostock D. E. (1986). Canine and feline mammary neoplasms. *Br Vet J*, 142(6), 506-515.

Carpenter, J. L., Andrews, L. K., & Holzworth, J. (1987). Tumors and tumor-like lesions. *In: J. Holzworth (Eds.), Diseases of the Cat: Medicine and Surgery (1ªEd, pp.406-411).* Philadelphia: Saunders.

Carvalho, S. M. T., Mourão Netto, M., Lima, E. N. P., Pimentel, A. M., Makdissi, F. B., Osório,...Soares, F. A. (2010). Sentinel node biopsy in breast cancer: results in a large series. *Braz J Med Biolog Resear*, 43(6), 593-599.

Castagnaro, M., Casalone, C., Bozzetta, E., De Maria, R., Biolatti, B., & Caramelli, M. (1998). Tumour grading and the one-year post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. *J Comp Pathol*, 119(3), 263-275.

Clive, R. T., Shan-rong S. & Barr, N. J. (2010). Techniques of Immunohistochemistry: Principles, Pitfalls and Standardization. *In: D.J. Dabbs (Eds.), Diagnostic immunohistochemistry: theranostic and genomic applications (3ªed.,pp. 1-41).* Philadelphia: Saunders.

Coelho, V. (2014). *Abordagem imuno-histoquímica otimiza a identificação de micrometástases nodais em cães portadores de carcinomas mamários* (Dissertação de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental). Universidade Paulista (UNIP), São Paulo.

Coletto, A. F. (2017). *Metástases de Carcinomas Mamários em linfonodos de cadelas: Variáveis Clínico-Patológicas e Estudo Imunohistoquímico* (Dissertação de Mestrado de Medicina Veterinária). Universidade Federal de Uberlândia - Faculdade de Medicina Veterinária, Brasil.

Crouch, J. E. & Lackey, M. B. (1969). The mammary gland - Its structure, relationships and blood supply. *In J.E. Crouch (Ed.), Text-Atlas of Cat Anatomy (1ªEd, pp. 183).* Philadelphia: Lea & Febiger.

De Araújo, M. R., Campos, L. C., Ferreira E. & Cassali, G. D. (2015). Quantitation of the regional lymph node metastatic burden and prognosis in malignant mammary tumors of dogs. *J Vet Intern Med*, 29(5), 1360-1367.

Della Salda, L., Sarli, G., Benazzi, C. & Marcato, P. S. (1993). Giant cells in anaplastic mammary carcinoma of the dog and cat. *J Comp Pathol*, 109(4), 345-360.

Deome, K. B., Faulkin, L. J., Bern, H. A. & Blair, P. B. (1959). Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice. *Cancer Res*, 19(5), 515-520.

Dorn, C. R., Taylor, D. O., Frye, F. L. & Hibbard H. H. (1968 a). Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, Califórnia, I. Methodology and description of cases. *J Natl Cancer Inst*, 40(2), 295-305.

Dorn, C. R., Taylor, D. O., Schneider, R., Hibbard, H. H. & Klauber M. R. (1968b). Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, Califórnia, II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *J Natl Canc Inst*, 40(2), 307-318.

Ellis, I. O., Schnitt, S. J., Sastre-Garau, X., Bussolati, G., Tavassoli, F. A., Eusebi, V. (2003). Invasive breast carcinoma. In: F.A. Tavassoli & P. Deville (Ed.), *Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs* (1ªEd., pp. 13-59). Lyon, France: World Health Organization Classification of Tumours, IARC Press.

Freitas, A. H. A., Wainstein, A. J. A. & Nunes, T. A. (2013). Ex vivo sentinel lymph node investigation in colorectal cancer. *J Coloproctol*, 33(1), 16-21.

Gamba, C. O., Dias, E. J., Ribeiro, L. G. R., Campos, L. C., Estrela-Lima, A., Ferreira E.,...Cassali, G. D. (2013). Histopathological and immunohistochemical assessment of invasive micropapillary mammary carcinoma in dogs: a retrospective study. *Vet J*, 196(2), 241-246.

<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.08.022>.

Giménez, F., Hecht, S., Craig, L. E. & Legendre, A. M. (2010). Early detection, aggressive therapy. *J Feline Med Surg*, 12(3), 214-224.

Goldschmidt, M., Peña, L., Rasotto, R. & Zappulli, V. (2011). Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet Pathol*, 48(1), 117-131.

<https://doi.org/10.1177/0300985810393258>.

Goldschmidt, M. H., Peña, L. & Zappulli, V. (2017). Tumours of the mammary gland. In: D.J. Meuten (Eds.), *Tumours in domestic animals* (5ª Ed., pp 123-165). Ames Iowa: John Wiley & Sons, Inc.

Hahn, K. A. & Adams, W. H. (1977). Feline mammary neoplasia: biological behavior, diagnosis, and treatment alternatives. *Feline Practice*, 25(2), 5-11.

Hahn, K. A., Bravo, L. & Avenelli J. S. (1994). Feline breast carcinoma as a pathologic and therapeutic model for human breast cancer. *In Vivo (Athens, Greece)*, 8(5), 825-828.

Hampe, J. F. & Misdorp, W. (1974). Tumours and dysplasias of the mammary gland. *Bull WHO*, 50(1-2), 111-133.

Hansen, N. M., Grube, B., Tuner, R. R., Brenner, R. J., Sim, M. S. & Giuliano, A .E. (2009). Impact of micrometastases in the sentinel node of patients with invasiver breast cancer. *J Clin Oncol*, 27(28), 4679-4684.

<https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2008.19.0686>.

Hayden, D. W., Barnes, D. M. & Johnson, K. H. (1989). Morphologic changes in the mammary gland of megestrol acetate-treated and untreated cats: a retrospective study. *Vet Pathol*, 26(2), 104-113.

Hayden, D. W., Johnston, S. D., Kiang, D. T., Johnson K. H. & Barnes, D. M. (1981). Feline mammary hypertrophy/fibroadenoma complex: clinical and hormonal aspects. *Am J Vet Res*, 42(10), 1699-1703.

Hayden, D. W. & Nielsen, S. W. (1971). Feline mammary tumours. *J Small Anim Pract*, 12(12), 687-698.

Hayes, A. (1977). Feline mammary gland tumors. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 7, 205-212.

Hayes, A. A. & Mooney, S. (1985). Feline mammary tumors. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 15(3), 513-520.

Hayes, H. M., Jr, Milne, K. L. & Mandell, C. P. (1981). Epidemiological features of feline mammary carcinoma. *Vet Rec*, 108(22), 476-479.

Hoinghaus, R., Von Wasielewski, R., Heiwicker-Trauewein, M., Freund, M. & Mischke, R. (2007). Immunocytological detection of lymph node metastases in dogs with malignant epithelial tumours. *J Comparat pathol*, 137, 1-8.

Hortobagyi, G. N., Connolly, J. L., D'Orsi, C. J., Edge, S. B., Mittendorf, E. A., Rugo, H. S.,...Giuliano, A. (2017). Breast. *In: AJCC Cancer Staging Manual (8ª Eds., pp. 589-636)*. Chicago, Illinois: The American College of Surgeons (ACS).

Ito, T., Kadosawa, T., Mochizuki, M., Matsunaga, S., Nishimura, R. & Sasaki, N. (1996). Prognosis of malignant mammary tumor in 53 cats. *J Vet Med Sci*, 58(8), 723-726.

Johnston, S. D., Kustritz, M. V. R. & Olson, P. N. S. (2001). Disorders of the mammary gland of the queen. *In: S.D. Johnston, M.V.R. Kustritz & P.N.S. Olson (Eds.), Canine and feline theriogenology (1ªEd., pp. 474-485)*. Philadelphia: WB Saunders.

Junqueira, L. C. & Carneiro, J. (2004). Aparelho Reprodutor Feminino. *In: L.C. Junqueira & J.Carneiro (Eds.), Histologia básica: Texto e Atlas (10 Eds., pp.449-452)*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Junqueira, L. C. & Carneiro, J. (2013). Aparelho Reprodutor Feminino. *In: L.C. Junqueira & J. Carneiro (Eds.), Histologia básica: Texto e Atlas (12ªEd., pp 427-446)*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Junqueira, L. C. & Carneiro, J. (2013). Sistema Imunitário e Órgãos Linfáticos. *In*: L.C. Junqueira & J. Carneiro (Eds.), *Histologia básica: Texto e Atlas* (12ªEd., pp 251-278). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Kamstock, D. A., Fredrickson, R. & Ehrhart, E. J. (2005). Lipid-rich carcinoma of the mammary gland in a cat. *Vet Pathol*, 42(3), 360-362. <https://doi.org/10.1354/vp.42-3-360>.

Kessler, M. & Von Bomhard, D. (1997). Mammary tumours in cats: epidemiologic and histologic features in 2,386 cases (1990-1995). *Kleintierpraxis*, 42, 459.

Klopfleisch, R. (2016). Mammary Tumors. *In*: R. Klopfleisch (Ed.), *Veterinary Oncology, A Short Textbook* (1ª Ed., pp. 99-108). Switzerland: Springer.

Kusewitt, D. F. & Rush, L. J. (2007). Neoplasia and tumor biology. *In*: M.D. McGavin & J.P. Zachary (Eds.), *Pathologic basis of veterinary disease*. (4ª Ed., pp. 253-298). Missouri: Mosby Elsevier.

Kustritz, M. V. (2007). Determining the optimal age for gonadectomy of dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc*, 231(11), 1665-1675. <https://doi.org/10.2460/javma.231.11.1665>.

Lana, S. E., Rutteman, G. R. & Withrow, S. J. (2006). Tumors of the mammary gland. *In*: S.J. Withrow & D.M. Vail (Eds.), *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* (4ª Ed., pp. 628-636). Canada: Saunders Elsevier.

Matos, A. J. F, Faustino, A., Lopes, C., Rutteman, G. R. & Gärtner, F. (2006). Detection of lymph node micrometastases in malignant mammary tumours in dogs by cytokeratin immunostaining. *Vet Rec*, 158(18), 626-630. <https://doi.org/10.1136/vr.158.18.626>.

Matsuda, K., Kobayashi, S., Yamashita, M., Hirayama, K., Kadosawa, T. & Taniyama, H. (2008). Tubulopapillary carcinoma with spindle cell metaplasia of the mammary gland in a cat. *J Vet Med Sci*, 70, 479-481. <https://doi.org/10.1292/jvms.70.479>.

Millanta, F., Verin, R., Asproni, P., Giannetti, G. & Poli, A. (2012). A case of feline primary inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical findings. *J Feline Med Surg*, 14(6), 420-423. <https://doi.org/10.1177/1098612X12442600>.

Mills, S. W., Musil, K. M., Davies, J. L., Hendrick, S., Duncan, C., Jackson, M. L.,...Simko, E. (2015). Prognostic value of histologic grading for feline mammary carcinoma: a retrospective survival analysis. *Vet Pathol*, 52(2), 238-249. <https://doi.org/10.1177/0300985814543198>.

Misdorp, W., Else, R. W., Hellme'n, E. & Lipscomb, T. P. (1999). Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. *In: World Health Organization, (Eds.), International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals (2ª Ed., pp.11-56), Vol 7. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology.*

Misdorp, W. (1991). Progestagens and mammary tumours in dogs and cats. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 125(1), 127-31.

Misdorp, W. (2002). Tumours of the mammary gland. *In: D.J. Meuten (Eds.), Tumors in Domestic Animals (4ª Ed., pp. 575-606). Iowa State Press, Iowa, USA.*

Misdorp, W., Romijn, A. & Hart, A. A. (1991). Feline mammary tumors: a case-control study of hormonal factors. *Anticancer Res*, 11(5), 1793-1797.

Miyake, Y., Yamamoto, H., Fujiwara, Y., Ohue, M., Sugita, Y., Tomita, N.,...Moden, M. (2001). Extensive micrometastases to lymph nodes as a marker for rapid recurrence of colorectal cancer: a study of lymphatic mapping. *Clin Canc Res*, 7, 1350-1357.

Moulton, J. E. (1990). Mammary tumors of the cat. *In: J.E. Moulton (Eds.), Tumors in domestic animals (3ª Ed., pp. 547-552). Berkeley: University of California Press.*

Nickel, R., Schummer, A. & Seiferle, E. (1986). The Anatomy of the Domestic Animals, Vol. 3. *Circulatory System and the Skin. Springer-Verlag, New York.*

Nielsen, S. W. (1967). The malignancy of mammary tumors in cats. *Mod Vet Pract*, 33, 245-252.

Ogilvie, G. K. (1983). Feline mammary neoplasia. *Compend Contin Educ Pract Vet*, 5, 384-391.

Overley, B., Shofer, F. S., Goldschmidt, M. H. Sherer D. & Sorenmo K. U. (2005). Association between ovariectomy and feline mammary carcinoma. *J Vet Intern Med*, 19(4), 560-563. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2005.tb02727.x>.

Papadopoulou, P. L., Patsikas, M. N., Charitanti, A., Kazakos G. M., Papazoglou L. G., Karayannopoulou M.,...Dimitriadis, A. (2009). The lymph drainage pattern of the mammary glands in the cat: a lymphographic and computerized tomography lymphographic study. *Anat Histol Embryol*, 38(4), 292-299. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.2009.00942.x>.

Patsikas, M. N. & Dessiris, A. (1996a). The lymph drainage of the mammary glands in the bitch: a lymphographic study. Part I: The 1st, 2nd, 4th and 5th mammary glands. *Anat Histol Embryol*, 25(2), 131-138.

Patsikas, M. N. & Dessiris, A. (1996b). The lymph drainage of the mammary glands in the bitch: a lymphographic study. Part II: the 3rd mammary gland. *Anat Histol Embryol*, 25(2), 139-143.

Patsikas, M. N., Karayannopoulou, M., Kaldrymidoy, E., Papazoglou L. G., Papadopoulou P. L., Tzegas S.,...Dessiris, A. K. (2006). The lymph drainage of the neoplastic mammary glands in the bitch: a lymphographic study. *Anat Histol Embryol*, 35(4), 228-234. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.2005.00664.x>.

Patsikas, M. N., Papadopoulou, P. L., Charitanti, A., Kazakos, G. M., Soultain, C. B., Tziris, N. E.,...Stamoulas, K. G. (2010). Computed tomography and radiographic indirect lymphography for visualization of mammary lymphatic vessels and the sentinel lymph node in normal cats. *Vet Radiol Ultrasound*, 51(3), 299-304. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.2009.01657.x>.

Peleteiro, M. C. (1994). Tumores mamários na cadela e na gata. *Rev Port Ciências Vet*, 89(509), 5-29.

Peleteiro, M. C., Marcos, R., Santos, M., Correia, J., Pissarra, H. & Carvalho, T. (2011). Glândula mamária. *In*: M. C. Peleteiro & T. Carvalho (Eds.), *Atlas de Citologia Veterinária* (1ªEd., pp. 215–231). Lisboa: Lidel.

Peña, L., Gama, A., Goldschmidt, M. H., Abadie, J., Benazzi, C., Castagnaro, M.,...Martín de las Mulas, J. (2013). Canine Mammary Tumors: A Review and Consensus of Standard Guidelines on Epithelial and Myoepithelial Phenotype Markers, HER2, and Hormone Receptor Assessment Using Immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*. 51: 127-145. <https://doi.org/10.1177/0300985813509388>.

Pereira, C. T., Rahal, S. C., de Carvalho Balieiro, J. C. & Ribeiro, A. A. C. M. (2003). Lymphatic drainage on healthy and neoplastic mammary glands in female dogs: can it really be altered?. *Anat Histol Embryol*, 32(5), 282-290. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0264.2003.00485.x>.

Pérez-Alenza, M. D., Jiménez, A., Nieto, A. I. & Peña, L. (2004). First description of feline inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical characteristics of three cases. *Breast Cancer Res*, 6(4), 300-307. <https://doi.org/10.1186/bcr790>.

Pinho, M. De S. L. (2005). Imunohistoquímica: O Estudo da Biologia Molecular ao Alcance de Todos. *Rev bras Coloproct*, 25(2), 188-191.

Pinho, M. S., & Gulbenkian, S. (2007). Innervation of the canine mammary gland: an immunohistochemical study. *Histol Histopathol*, 22, 1175-1184.

Raharison, F. & Sautet, J. (2006). Lymph drainage of the mammary glands in female cats. *J Morphol*, 267(3), 292-299. <https://doi.org/10.1002/jmor.10403>.

Raharison, F. & Sautet, J. (2007). The topography of the lymph vessels of mammary glands in female cats. *Anat Histol Embryol*, 36(6), 442-452. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.2007.00783.x>.

Rasotto, R., Caliarì, D., Castagnaro, M., Zanetti, R. & Zappulli, V. (2010). An immunohistochemical study of HER-2 expression in feline mammary tumours, *J Comp Pathol*, 144(2-3), 170-179. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2010.08.010>.

Rasotto, R., Zappulli, V., Castagnaro, M. & Goldschmidt, M. H. (2012). A retrospective study of those histopathologic parameters predictive of invasion of the lymphatic system by canine mammary carcinomas. *Vet Pathol*, 49(2), 330-340. <https://doi.org/10.1177/0300985811409253>.

Rutteman, G. R., Withrow, S. J. & MacEwen, E. G. (2001). Tumours of the mammary gland. In: S.W. Withrow & E.G. MacEwen (Eds.), *Small Animal Clinical Oncology*, (3ªEd., pp. 467-473). Philadelphia, USA: WB Saunders.

Sarli, G., Brunetti, B. & Benazzi, C. (2006). Mammary mucinous carcinoma in the cat. *Vet Pathol*, 43(5), 667-673. <https://doi.org/10.1354/vp.43-5-667>.

Seixas, F., Palmeira, C., Pires, M. A. & Lopes, C. (2007). Mammary invasive micropapillary carcinoma in cats: clinicopathologic features and nuclear DNA content. *Vet Pathol*, 44(6), 842-848. <https://doi.org/10.1354/vp.44-6-842>.

Seixas, F., Palmeira, C., Pires, M. A. & Lopes, C. (2008). Are complex carcinoma of the feline mammary gland and other invasive mammary carcinoma identical tumours? Comparison of clinicopathologic features, DNA ploidy and follow up. *Res Vet Sci*, 84(3), 428-433. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.06.005>.

Seixas, F., Palmeira, C., Pires, M. A., Bento, M. J. & Lopes, C. (2011). Grade is an independent prognostic factor for feline mammary carcinomas: a clinicopathological and survival analysis, *Vet J*, 187(1), 65-71.

Silver, I. A. (1966). The anatomy of the mammary gland of the dog and cat. *J Small Anim Pract*, 7(11), 689-696.

Skorupski, K. A., Overley, B., Shofer, F. S., Goldschmidt, M. H., Miller, C. A. & Sorenmo, K. U. (2005). Clinical characteristics of mammary carcinoma in male cats. *J Vet Intern Med*, 19(1), 52-55. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2005.tb02658.x>.

Solano-Gallego, L. (2010). Reproductive system. *In*: L. Solano-Gallego (Eds.), *Atlas of canine and feline cytology* (2ªEd., pp. 274- 308). USA: Saunders.

Sorenmo, K. U., Rasotto, R., Zappulli, V. & Goldschmidt, M. H. (2011). Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Vet Pathol*, 48(1), 85-97. <https://doi.org/10.1177/0300985810389480>.

Sorenmo, K. U., Worley, D. R. & Goldschmidt, M. H. (2013). Tumors of the Mammary Gland. *In*: S.J. Withrow, D.M. Vail, & R.L. Page (Eds.), *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* (5ªEd., pp. 538-556). St. Louis, Mo.: Saunders Elsevier.

Teixeira, M. J., Sobral, A. P. V., Abreu-e-Lima, M. C., Maia, F. C. L., Christilis, M., Souza, D. M. B.,...Wischral, A. (2011). Avaliação da supressão da proteína p53 e das mutações no éxon 8 do gene TP53 em carcinomas mamários caninos e glândulas normais. *Pesq. Vet. Bras*, 31(6), 521-526. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2011000600011>.

Tsiapali, E., Schmidt, M. M., Dizon, D., Steinhoff, M. & Gass J. (2011). Patterns of cellular distribution with the sentinel node positive for breast cancer. *Int J Breast Cancer*, 2011, 873-987. <https://doi.org/10.4061/2011/873987>.

Vascellari, M., Baioni, E., Ru, G., Carminato, A. & Mutinelli, F. (2009). Animal tumor registry of two provinces in northern Italy: incidence of spontaneous tumors in dogs and cats. *BMC Vet Res*, 5, 39. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-5-39>.

Vet-OncoNet. (2020). Registo Oncológico Animal 2020 (1ªEd., Vol.1). Portugal. <https://www.vetonconet.pt>.

Weigelt, B., Peterse, J. L. & Van't Veer, L. J. (2005). Breast cancer metastasis: Markers and modelis. *Nat Rev Cancer*, 5(8), 591-602. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16056258/>.

Weyer, K., Head, K. W., Misdorp, W. & Hampe, J. F. (1972). Feline malignant mammary tumors. Part I. Morphology and biology: some comparisons with human and canine mammary carcinomas. *J Natl Cancer Inst*, 49(6), 1697–1704.

Zappulli, V., Caliarì, D., Rasotto, R., Ferro, S., Castagnaro, M. & Goldschmidt, M. H. (2013). Proposed classification of the feline 'complex' mammary tumors as ductal and intraductal papillary mammary tumors. *Vet Pathol*, 50, 1070–1077. <https://doi.org/10.1177/0300985813488894>.

Zappulli, V., Peña, L., Rasotto, R., Goldschmidt, M. H., Gama, A., Serrugs, J. L. & Kiupel, M. (2019). Volume 2: Mammary tumors. In M. Kiupel (Eds.), *Surgical Pathology of Tumors of Domestic Animals* (pp. 197-232). Davis-Thompson DVM Foundation: EUA.

VIII. Anexo

XVII CONGRESSO INTERNACIONAL VETERINÁRIO MONTENEGRO -MEDICINA INTERNA SEM SEGREDOS
Santa Maria da Feira, 22 e 23 de Outubro de 2021
Projeto financiado pela FMV-ULHT.

UNIVERSIDADE
LUSÓFONA

FMV
faculdade
de medicina veterinária

DNAtech.

AVALIAÇÃO DA UTILIDADE DA IMUNOHISTOQUÍMICA PARA A DETECÇÃO DE MICROMETÁSTASES OCULTAS EM CARCINOMAS MAMÁRIOS EM GATOS

De Moura, C. J.; Faria, P.¹

Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias (FMV-ULHT), Campo Grande, 174, 1164-004 Lisboa
(Portugal) | Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias, Faculdade Lusófona, 1749-016 Lisboa
Email: catarina.moura@lusofona.pt | p.faria@lusofona.pt

1

Introdução

Os tumores mamários em gatos são a terceira neoplasia mais comum nesta espécie, sendo a maioria carcinomas mamários do tipo simples (1). A taxa de malignidade dos tumores mamários é de 85%, sendo frequente a metastatização em linfonodos, pulmões e, menos frequentemente, fígado e pleura (2). Os linfonodos regionais apresentam um papel fundamental para o prognóstico do animal (3). Devido à elevada densidade celular dos linfonodos, por vezes, as micrometástases não são detetadas pelo método convencional de diagnóstico (4). A técnica de imunohistoquímica é muito utilizada em Medicina Humana e é, cada vez mais, utilizada como uma técnica de diagnóstico auxiliar em Medicina Veterinária.

2

Objetivos

Este estudo tem como finalidade averiguar se o uso da técnica de imunohistoquímica em gatos é um método benéfico e eficaz para a deteção de micrometástases ocultas em linfonodos.

3

Materiais e Métodos

Este estudo retrospectivo foi realizado com 100 casos de carcinomas mamários em gatos e 125 linfonodos regionais, previamente diagnosticados e graduados através da técnica de histopatologia com a coloração HE (Hematoxilina-Eosina).

Foram realizadas duas técnicas para a identificação de metástases nos linfonodos, a técnica de histopatologia com coloração HE e a técnica de imunohistoquímica com os anticorpos anti-pan-citokeratina 1 e 3 (AE1 e AE3). As metástases foram classificadas em macrometástases (>2 mm), em micrometástases (0.2-2 mm) e em células tumorais isoladas (< 0.2 mm), de acordo com "American Joint Committee on Cancer" (AJCC). Foi calculada a sensibilidade da técnica de imunohistoquímica.

4

Resultados

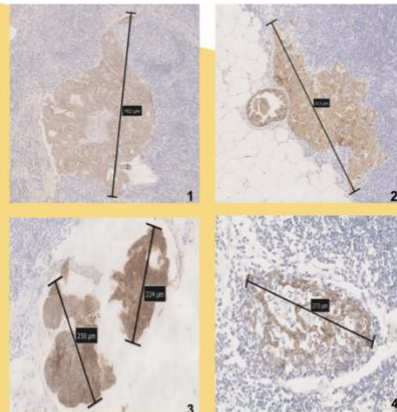
Através da técnica de imunohistoquímica foram identificadas metástases em 8,8% (11/125) dos linfonodos. No entanto, 54,54% (6/11) das metástases detetadas foram identificadas por ambas as técnicas. Em relação aos linfonodos metastizados, 72,73% (8/11) eram micrometástases e 27,27% (3/11) eram macrometástases.

A técnica de imunohistoquímica com os anticorpos AE1 e AE3 identificou micrometástases ocultas em 5% (5/100) dos casos (Figura 1, 2, 3 e 4).

A sensibilidade da técnica de imunohistoquímica foi de 100%.

Referências bibliográficas:

1. Meador, W. Essie, R.W., Helmerin, E. & Lipscomb, T.P. (1989). Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. In: World Health Organization, (Eds.), *International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals* (2^a Ed., pp. 11-56). Vol 7. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology.
2. Goldschmidt, M.H., Peña, I. & Zappulli, V. (2017). Tumours of the mammary gland. In: D.J. Meuten (Eds.), *Tumours in domestic animals* (2^a Ed., pp. 125-165). Ames Iowa: John Wiley & Sons, Inc.
3. Soremo, K.U., Worley, D.R. & Goldschmidt, M.H. (2013). Tumors of the Mammary Gland. In: S.J. Withrow, D.M. Vail & R.L. Page (Eds.), *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* (5th Ed., pp. 538-556). St. Louis, Mo.: Saunders Elsevier.
4. Miyake, Y., Yamamoto, H., Fujiwara, Y., Chui, M., Sugita, Y., Tomita, N., et al. (2001). Extensive micrometastases to lymph nodes as a marker for rapid recurrence of colorectal cancer: a study of lymphatic mapping. *Clin. Canc. Res.*, 7, 1350-1357.



Figuras 1, 2, 3 e 4: Fotografias de lâminas digitalizadas de linfonodos inguinais com micrometástases ocultas coradas através da técnica de imunohistoquímica com os anticorpos AE1 e AE3, objetiva (x10). Original da autora.

5

Conclusão

A técnica de imunohistoquímica com os anticorpos AE1 e AE3 demonstrou ser fundamental na deteção de micrometástases ocultas em linfonodos regionais de cadeias mamárias de gatos com carcinomas mamários.

Este estudo comprovou que a técnica de imunohistoquímica com os anticorpos AE1 e AE3 é o método de diagnóstico mais sensível de micrometástases ocultas em linfonodos.

Figura 2. : Poster Científico de Medicina Veterinária selecionado para apresentação com o tema alvo da dissertação, tendo figurado nos dez primeiros lugares do Congresso Internacional Veterinário Montenegro. Original da autora.