UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AZUL DE METILENO E LIPIODOL PARA LOCALIZAÇÃO DE LINFONODO SENTINELA NO MASTOCITOMA CUTÂNEO CANINO

Jéssica Francielle Camargo

PORTO ALEGRE
2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AZUL DE METILENO E LIPIODOL PARA LOCALIZAÇÃO DE LINFONODO SENTINELA NO MASTOCITOMA CUTÂNEO CANINO

Autor: Jéssica Francielle Camargo

Tese apresentada como requisito parcial da obtenção do título de Doutor em Cirurgia e Anestesiologia Veterinária pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias – UFRGS.

Orientadora: Profª. Drª Stella de Faria Valle

Coorientadora: Profª. Drª Priscila Beatriz da Silva Serpa

PORTO ALEGRE
2025

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

CIP - Catalogação na Publicação

Camargo, Jéssica Francielle
ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AZUL DE METILENO E LIPIODOL PARA LOCALIZAÇÃO DE LINFONODO SENTINELA NO MASTOCITOMA CUTÂNEO CANINO / Jéssica Francielle Camargo. -- 2025.
77 f.
Orientadora: Stella de Faria Valle.

Coorientadora: Priscila Beatriz da Silva Serpa.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2025.

1. Oncologia Veterinária. 2. Mastocitoma cutâneo canino. 3. Linfonodo sentinela. 4. Lipiodol. I. Valle, Stella de Faria, orient. II. da Silva Serpa, Priscila Beatriz, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Jéssica Francielle Camargo

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AZUL DE METILENO E LIPIODOL PARA LOCALIZAÇÃO DE LINFONODO SENTINELA NO MASTOCITOMA CUTÂNEO CANINO

Aprovada em Porto Alegre, 21 de outubro de 2025.

APROVADO POR:

_____

Profa. Dra. Stella de Faria Valle
Orientador e Presidente da Comissão

_____

Prof. Dr. Cristiano Gomes
Membro da Comissão

_____

Prof. Dr. Daniel Curvello De Mendonça Muller
Membro da Comissão

_____

Prof. Dr. Jorge Luiz Costa Castro
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço pelo encerramento de seis anos na UFRGS e a todas as pessoas incríveis que cruzaram meu caminho nesse período. Agradeço imensamente à minha equipe extraordinária: Simone Bianchi, Haiumy Garcia, Caroline Ferreira e Gabriela Foppa.

Um agradecimento especial à Simone Bianchi, que, mesmo não estando mais na universidade, sempre dava um jeito de pausar a agenda de atendimentos para nos auxiliar. Com certeza, este projeto não seria possível sem ela. E mais uma vez obrigada por ter despertado o amor pelos linfonodos e a oncologia.

Meu agradecimento também à Haiumy, por aceitar ser a anestesista do meu projeto, por sempre topar as "tretas" e por anestesiar o nosso gordinho Leleco.

Não poderia deixar de agradecer ao Setor de Oncologia, que me recebeu de braços abertos e onde aprendi muito. Luciane e Lucianinha, vocês não apenas me ensinaram a parte prática, mas também como ser uma veterinária mais humana.

Ao professor Cristiano Gomes pelos ensinamentos na parte de cirurgia oncológica durante todos esses anos. Foi fundamental para o meu crescimento durante esses anos. Serei eternamente grata.

Meu querido orientador, professor Emerson Antonio Contesini, que infelizmente não está mais entre nós, sempre acreditou em mim e me incentivou quando, ainda no mestrado, decidi escolher a área da oncologia. Saibas que sempre lembrarei de ti com muito afeto; esta conquista seria impossível se tu não tivesses acreditado em mim. Com certeza nos encontraremos um dia.

Ao meu amor, Rafael Henrique Rovedder, que sempre entendeu que a minha ausência era necessária para o meu crescimento, me apoiando e tendo muita paciência em todos os momentos, inclusive quando eu passava dias em outra cidade para a realização do projeto de pesquisa.

Aos meus cães, em especial Logan, Storm, Kiara, Hanna e Ralf que tornaram a jornada mais leve e me motivaram a buscar cada vez mais conhecimento para ajudar outros animais. E todos os que sempre carregarei comigo no coração: Punk, Shana e meu coelho Oreo.

À minha orientadora, Stella de Faria Valle, que, mesmo não sendo da área, me acolheu durante todos esses anos e não mediu esforços para que fizéssemos o melhor pelo projeto.

À minha coorientadora, Priscila Beatriz da Silva Serpa, que muitas vezes me puxou as orelhas e me ensinou tanto no período em que estive na Universidade de Cornell-EUA.

Ao professor Rodrigo Horta, que tantas vezes me ajudou com casos clínicos e dúvidas do projeto, e é fonte de inspiração para mim na oncologia.

Às minhas colegas de pós-graduação, Mirela Paim e Luciana Teixeira, pelo grande apoio e pelo conhecimento compartilhado sobre publicações e temas afins da área acadêmica.

À minha família, que sempre compreendeu a minha ausência ao longo desses anos e me apoiou para que eu buscasse mais conhecimento.

Aos meus colegas do Centro Veterinário Wazlawik, os quais sempre me incentivaram e motivavam mesmo quando eu não estava bem.

Aos meus queridos pacientes e aos tutores, que se tornaram amigos ao longo do caminho, sem vocês, nada seria possível.

“Todos nós temos um inimigo, e o inimigo do câncer é a pesquisa”.

Michael Bishop

RESUMO

O mastocitoma é um dos tumores mais frequentes encontrados em cães. A cirurgia é o tratamento de eleição e, devido ao papel dos linfonodos na disseminação linfática desse tipo tumoral, a avaliação linfonodal é fundamental para o estadiamento, definição terapêutica e prognóstico. O linfonodo sentinela (SLN) é o primeiro a drenar a área tumoral e pode variar entre indivíduos. Já o linfonodo regional (RLN) é o linfonodo anatomicamente considerado mais provável para aquela região com base em mapas linfáticos; entretanto, ele pode não coincidir com o SLN do tumor. Diante disso, diferentes técnicas têm sido empregadas para mapear corretamente o SLN. Este estudo prospectivo teve como objetivo comparar a linfografia indireta com óleo iodado (Lipiodol, IL) ao método colorimétrico com azul de metileno (MB) para avaliação do LS em 21 cães (26 tumores). O IL localizou 29 LNs (em 21 cães) e não houve opacificação em cinco tumores; o MB identificou 34 LS (em 21 cães), com falha em apenas dois tumores. Ao todo, 38 linfonodos foram removidos (em 21 cães), e 57,1% (12/21) dos animais apresentaram metástase linfonodal. Entre as técnicas, IL e MB concordaram em 73,1% dos tumores (19/26). A concordância entre o linfonodo regional e o sentinela foi de 61,5% quando o mapeamento foi feito pelo IL e de 76,9% quando feito pelo MB, aumentando para 84,6% quando ambas as técnicas foram utilizadas em conjunto. Observou-se associação entre tamanho tumoral e metástase linfonodal ($p=0,048$), enquanto o status da margem cirúrgica não apresentou associação significativa com metástase ($p>0,05$). No mapeamento linfático, as técnicas mostraram-se complementares: o MB identificou seis linfonodos axilares sentinelas em cinco tumores nos quais o IL falhou, enquanto o IL revelou alguns linfonodos abdominais não corados pelo MB em dois tumores. Nos cinco tumores em que o IL não identificou SLN e o MB sim, quatro foram classificados como HN1, um como HN2 e um como HN0. Esses achados indicam que a ausência de opacificação pelo IL não exclui linfonodos clinicamente relevantes e sustentam o uso combinado das técnicas para reduzir o risco de subestadiamento.

Palavras-chave: canino, mastócitos; linfadenectomia; linfonodo sentinela.

ABSTRACT

Mast cell tumor (MCT) is one of the most common neoplasms found in dogs. Surgery is the treatment of choice, and due to the role of lymph nodes in the lymphatic spread of this tumor type, lymph node assessment is essential for staging, therapeutic planning, and prognosis. The sentinel lymph node (SLN) is the first node to drain the tumor area and may vary among individuals. The regional lymph node (RLN), on the other hand, is the anatomically expected node for that region based on lymphatic maps; however, it may not coincide with the SLN of the tumor. Therefore, different techniques have been employed to accurately map the SLN. This prospective study aimed to compare indirect lymphography with iodized oil (Lipiodol, IL) and the colorimetric method using methylene blue (MB) for SLN evaluation in 21 dogs (26 tumors). IL localized 29 lymph nodes (in 21 dogs) and failed to opacify nodes in five tumors, while MB identified 34 SLNs (in 21 dogs), with failure in only two tumors. In total, 38 lymph nodes were removed (in 21 dogs), and 57.1% (12/21) of the animals presented lymph node metastasis. Between the techniques, IL and MB agreed in 73.1% of the tumors (19/26). Concordance between the regional lymph node and the sentinel lymph node was 61.5% when mapping was performed with IL and 76.9% when performed with MB, increasing to 84.6% when both techniques were used together. An association was observed between tumor size and lymph node metastasis ($p=0.048$), whereas surgical margin status showed no significant association with metastasis ($p>0.05$). In lymphatic mapping, the techniques proved to be complementary: MB identified six axillary sentinel lymph nodes in five tumors where IL failed, while IL revealed some abdominal lymph nodes not stained by MB in two tumors. Among the five tumors in which IL failed to identify SLNs but MB did, four were classified as HN1, one as HN2, and one as HN0. These findings indicate that the absence of opacification by IL does not exclude clinically relevant lymph nodes and support the combined use of both techniques to reduce the risk of understaging.

Keywords: canine, mast cells; lymphadenectomy; sentinel lymph node.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Algoritmo para aplicação rápida do sistema de graduação citológica para mastocitoma cutâneo canino. 16
Figura 2 – Algoritmo de investigação após o diagnóstico citológico do MCTc. 16
Figura 3 – Canino com tumor cutâneo em membro torácico e seu linfonodo sentinela 26
Figura 4 – Diagrama dos territórios linfáticos demonstrando os vasos linfáticos e seus linfonodos correspondentes. 27
Figura 5 – Mastocitoma e sua associação com a área de drenagem linfática. 28
Figura 6 – Desenho esquemático demonstrando a cadeia linfática após injeção peritumoral de azul patente 32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sistema de estadiamento clínico do mastocitoma canino segundo a OMS 17
Tabela 2 – Sistema de estadiamento clínico adaptado do sistema da OMS. 18
Tabela 3 – Sobrevida de cães com tratamento cirúrgico de mastocitoma de acordo com o grau histológico (a) adaptado de London; Thamm (2020). 20
Tabela 4 – Critérios histológicos para graduação de tumores de mastócitos segundo Patnaik *et al* (1984). 21
Tabela 5 – Critérios para identificação de mastocitoma de alto grau, adaptado de Kiupel. et al (2011). 22
Tabela 6 – Fatores prognósticos associados com o mastocitoma canino (MCT) adaptado de De Nardi et al. (2022). 23
Tabela 7 – Critério citológico para a determinação de doença metastática de mastócitos nos linfonodos regionais. 29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IO: Iodized Oil

IL: Indirect Lymphography

MB: Methylene Blue

cMCT: Cutaneous Mast Cell Tumor

MCT: Mast Cell Tumor

SLN: Sentinel Lymph Node

RLN: Regional Lymph Node

LN: Lymph node

IHQ:Imunohistoquímica

IHC: Immunohistochemistry

CCNU: ciclohexilcloroetilnitrosureia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **13**
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **14**
2.1 MASTOCITOMA CANINO **14**
2.1.2 Apresentação clínica e síndrome paraneoplásica 14
2.1.3 Diagnóstico e estadiamento 15
2.1.4 Cirurgia e margens cirúrgicas 19
2.1.5 Graduação histopatológica e prognóstico 20
2.1.6 Quimioterapia adjuvante 23
2.1.7 Imunohistoquímica 25
2.2 Linfonodo sentinela e mapeamento linfático 25
2.2.1 Citologia do linfonodo 28
2.2.3 Histopatologia do linfonodo 30
2.4.4 Mapeamento com azul de metileno intraoperatório 31
2.4.5 Linfangiografia indireta radiográfica 32
3 OBJETIVOS **34**
4 MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO **34**
5 ARTIGO **35**
Abstract 35
Introduction 36
MATERIAL AND METHODS 37
Study Design and Case Selection 37
Indirect lymphography 38
Intraoperative SLN mapping with MB and surgical procedure 39
Statistical Analysis 40
Patient demographics and tumor characteristics 41
Indirect lymphography mapping 43
Intraoperative methylene blue colorimetric mapping 46
Surgical procedure 47
Agreement of IL and MB 49
DISCUSSION **53**
Acknowledgments **60**
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS **67**
7. Referências Bibliográficas **68**
APÊNDICE A 72

ANEXO B 75

1 INTRODUÇÃO

O mastocitoma cutâneo canino (MCTc) é uma das neoplasias cutâneas mais frequentes em cães, representando cerca de 16% a 21% dos tumores cutâneos diagnosticados (Strefezzi *et al.*, 2009). Existe grande variação entre os pacientes quanto ao prognóstico, sinais clínicos e evolução da doença, diferenças que podem ocorrer de acordo com o estadiamento, o grau histológico assim como a localização anatômica do tumor (Willmann *et al.*, 2021). O comportamento biológico do mastocitoma (MCT) é muito variável, tanto clinicamente quanto histologicamente, e, embora diversos estudos tenham sido realizados, ainda não existe um método único capaz de definir esse comportamento nos animais (De Nardi *et al.*, 2022; Horta *et al.*, 2018). Essa forma heterogênea torna o MCTc um desafio clínico-cirúrgico, o qual exige uma abordagem individualizada baseada em múltiplos fatores prognósticos.

Dentre os fatores prognósticos negativos no MCTc, a avaliação linfonodal é necessária uma vez que o status do linfonodo (LN) auxilia na definição do planejamento terapêutico e do prognóstico. A presença de metástases nos linfonodos regionais está associada à piora significativa no prognóstico e redução da sobrevida (Blackwood *et al.*, 2012; Weishaar *et al.*, 2014). Portanto, a linfadenectomia tem sido recomendada em pacientes que possuam esse tipo tumoral. Estudos têm demonstrado que a ressecção tumoral associada à linfadenectomia e ao tratamento adjuvante melhora o prognóstico de cães com MCTC de alto grau e com metástase nodal evidente (Chalfon *et al.*, 2022). Adicionalmente, estudos enfatizam a provável importância da linfadenectomia profilática em pacientes com mastocitoma grau I (Sabattini *et al.*, 2021). No entanto, a identificação precisa dos linfonodos e sua drenagem linfática têm sido um obstáculo, pois, dependendo da área do tumor, essa drenagem pode ser variável e imprevisível.

Devido a isso, inúmeras técnicas de mapeamento linfonodal têm sido incorporadas na rotina cirúrgica oncológica na medicina veterinária com o objetivo de melhorar a detecção do linfonodo sentinela (SLN). O uso de corantes vitais e agentes de contraste radiológico é uma estratégia promissora nesse cenário (Annoni; Borgonovo; Aralla, 2023; Brissot; Edery, 2017). Entre os corantes que podem ser utilizados, o azul de metileno (MB) possui fácil aplicação, baixo custo e boa visualização intraoperatória. Por outro lado, o lipiodol (IO), um contraste iodado radiopaco, oferecendo informações para o planejamento cirúrgico.

A avaliação comparativa desses dois métodos no mapeamento linfático de cães com MCTc permite investigar sua eficácia, reprodutibilidade e aplicabilidade clínica.

A partir do exposto, o objetivo é fornecer uma revisão abrangente da literatura sobre o MCTc; com ênfase no processo metastático linfático e nas técnicas de mapeamento do linfonodo sentinela. Além disso, apresenta um artigo que avalia a utilização de um contraste lipossolúvel no mapeamento radiográfico do linfonodo sentinela associado ao azul de metileno em cães acometidos por esse tipo tumoral.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MASTOCITOMA CANINO

Os mastócitos são células produzidas na medula óssea, migrando posteriormente para os tecidos periféricos, onde diferenciam-se em mastócitos maduros sob a influência de citocinas locais. Estão presentes na maioria dos tecidos em animais saudáveis, especialmente na pele e na superfície mucosa. Raramente são vistos na circulação sistêmica, e ocasionalmente podem ser encontrados na medula óssea (Scott; Stockham, 2000).

De acordo com um estudo realizado em Porto Alegre, no Estado do Rio Grande do Sul (Brasil), o MCT foi o tumor cutâneo mais frequentemente diagnosticado em cães, representando 22,4% dos casos (Meirelles *et al*., 2010). Embora seja mais comumente encontrado em cães idosos, com idade média entre 8 e 9 anos, há relatos de ocorrência em animais jovens (London; Thamm, 2020).

A etiologia dos MCTs nos cães não é bem conhecida. Historicamente, correlacionou-se com a aplicação de irritantes cutâneos ou inflamação crônica. Entretanto, a anormalidade molecular mais bem descrita em cães com MCTc envolve o receptor de tirosina quinase (RTK) KITr é expresso numa variedade de células, a qual inclui melanócitos, células tronco hematopoiéticas e mastócitos, dentre outros (London; Thamm, 2020).

2.1.2 Apresentação clínica e síndrome paraneoplásica

A apresentação clínica dos MCTs é variável. Os MCTc bem diferenciados se apresentam como lesões solitárias sem pelo com crescimento lento durante meses; enquanto os MCTs pouco diferenciados podem apresentar lesões pruriginosas, ulceradas de crescimento rápido, ulceradas, e algumas vezes com pequenas lesões satélites próximas. Existem ainda pacientes que desenvolvem MCTc múltiplos, com nódulos (>3cm) espalhados por toda a pele (Blackwood *et al.*, 2012). O MCTc pode se disseminar de forma sistêmica, tendo como

consequência a formação de leucemia de mastócitos que embora seja rara, pode ocorrer (London; Seguin, 2003).

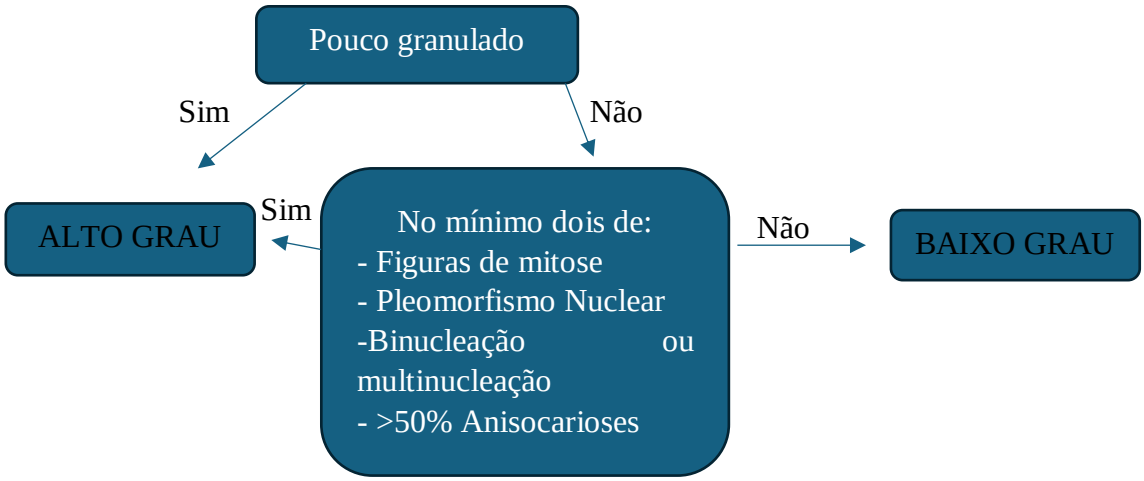
A localização do MCTc é variada, entretanto, aproximadamente 50% dos MCTs cutâneos ocorrem no tronco e região perineal, 40% nos membros, e 10% no pescoço e cabeça (London; Thamm, 2020). A úlcera gastrointestinal tem sido observada em humanos, bovinos, cães e gatos com MCTc e é uma síndrome paraneoplásica (Howard *et al.*, 1969). Um estudo em cães demonstrou maiores concentrações plasmáticas de histamina e menores de gastrina e em cães com MCTc em comparação com cães saudáveis. A última sugere uma evidência indireta para a presença de hiperacidez secundária a hiperhistaminemia (Fox *et al.*, 1990).

A manipulação mecânica do tumor ocasionalmente pode provocar a degranulação dos mastócitos com formação de eritema e pápula ao redor dos tecidos, sendo isso chamado de Sinal de Darier (Blackwood *et al.*, 2012). Alguns sinais clínicos como anorexia, hematêmese, hematoquezia, melena, anemia, dor abdominal, perfuração intestinal e peritonite podem estar associados com a presença de ulcerações no trato gastrointestinal (Daleck; Rocha; Ferreira, 2016).

2.1.3 Diagnóstico e estadiamento

Após a avaliação clínica, o diagnóstico dos MCTs é realizado através de exames da citologia obtida por punção aspirativa com agulha fina (PAAF). A citologia permite um diagnóstico de 92 a 96% dos MCTs caninos (BAKER-GABBy; Hunt; France, 2003). Para a determinação da graduação citológica (Camus *et al.*, 2016; Paes *et al.*, 2022). são aplicados critérios baseados nas classificações histológicas a qual permitem a graduação citológica, auxiliando a prever o comportamento tumoral (Berlato *et al.*, 2021; Camus *et al.*, 2016; Paes *et al.*, 2022). O algoritmo de graduação citológica (Figura.1) como objetivo aumentar a correlação com os critérios histopatológicos (Camus *et al.*, 2016). De acordo com esse algoritmo, os MCTc são classificados como alto grau quando apresentam citoplasma pouco granulado ou quando exibem pelo menos duas das quatro características: presença de figuras de mitose, anisocariose, binucleação ou multinucleação, e pleomorfismo nuclear. No caso do diagnóstico do MCTc, a citologia não é substitutiva da histopatologia, que deve ser sempre realizada após a excisão da massa (Blackwood *et al.*, 2012). A histopatologia fornece dados importantes sobre o prognóstico da doença, pois classifica O MCTc segundo seu potencial de malignidade, atribuindo ao grau histopatológico, fornecendo informações para a terapêutica e o estadiamento da doença (Daleck; Rocha; Ferreira, 2016).

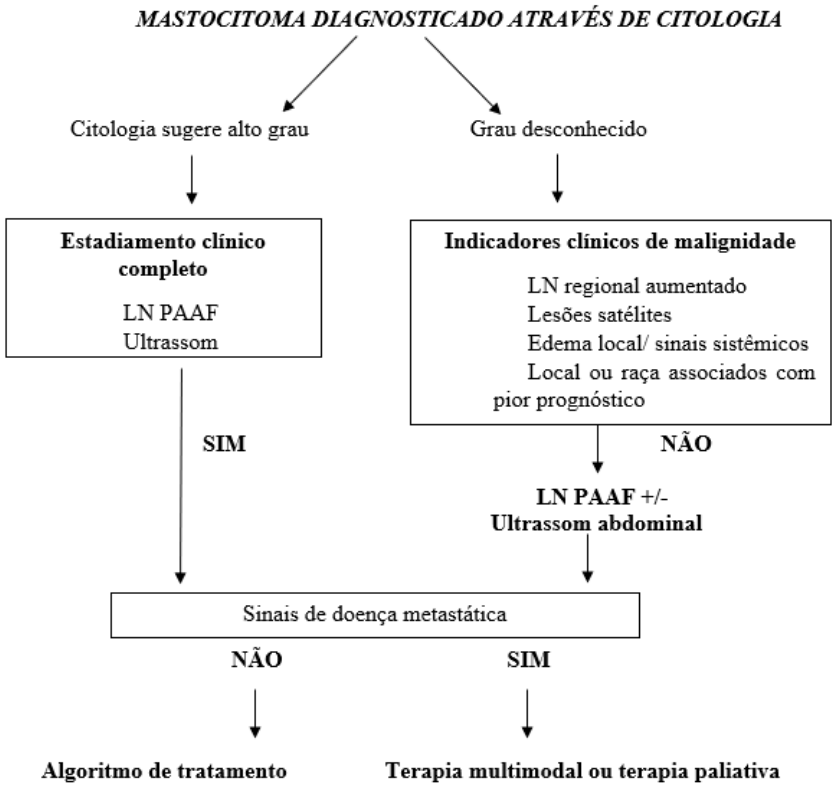
Figura 1 – Algoritmo para aplicação rápida do sistema de graduação citológica para mastocitoma cutâneo canino.



Fonte: Adaptado de Camus *et al.*, 2016.

Para uma melhor abordagem diagnóstica do MCTc, um algoritmo pode ser utilizado a partir da citologia (Figura. 2).

Figura 2 – Algoritmo de investigação após o diagnóstico citológico do MCTc.



Fonte: Adaptado de Blackwood *et al.*, 2012.

Após o diagnóstico de MCTc, o estadiamento clínico segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (Tabela 1) deve ser realizado para definir a natureza e a extensão da doença (Owen *et al*., 1980).

Tabela 1 – Sistema de estadiamento clínico do mastocitoma canino segundo a OMS

ESTÁDIO	DESCRIÇÃO
0	Tumor solitário, excisado incompletamente da derme, identificado histologicamente, sem envolvimento do linfonodo regional. a. Sem sinais sistêmicos b. Com sinais sistêmicos
I	Tumor solitário confinado à derme, sem envolvimento do linfonodo regional a. Sem sinais sistêmicos b. Com sinais sistêmicos
II	Tumor solitário confinado à derme, com envolvimento do linfonodo regional a. Sem sinais sistêmicos b. Com sinais sistêmicos
III	Múltiplos tumores dérmicos, grandes, tumores infiltrados com ou sem envolvimento do linfonodo regional a. Sem sinais sistêmicos b. Com sinais sistêmicos
IV	Qualquer tumor com metástases distantes, incluindo sangue ou envolvimento de medula óssea

Legenda: OMS: Organização Mundial da Saúde Fonte: London; Thamm (2020).

Os MCTs podem metastatizar para o linfonodo de drenagem, baço, fígado, medula óssea e podem originar lesões cutâneas satélites. O estadiamento completo deve incluir ultrassonografia abdominal, radiografia torácica, e a PAAF do linfonodo de drenagem, no mínimo (Blackwood *et al.*, 2012). Este estadiamento clínico pode ser usado concomitante com as classificações histológicas do tumor, permitindo uma melhor avaliação de prognóstico, terapia e decisões clínicas. A citologia guiada por ultrassom do baço e do fígado como parte do estadiamento tem sido recomendada. No entanto, em uma população de 136 cães com MCT, apenas um apresentou metástase visceral, indicando que a citologia de órgãos não constitui um

fator relevante para ser incluído no estadiamento de cães com MCTc de baixo grau (grau I / II) devido a sua baixa frequência de metástases viscerais (Rinaldi *et al.*, 2022).

Em 2008, durante o 1º Encontro Mundial de Oncologia Veterinária em Copenhagen (ESVONC/VCS), um novo sistema de estadiamento clínico foi proposto para cães com MCT e considerou que qualquer paciente com doença metastática no linfonodo, pertenceria ao estádio IV, não importando o tamanho dos linfonodos e o número de tumores (Tabela 2) (Daleck; Rocha; Ferreira, 2016).

Tabela 2 – Estadiamento clínico para o mastocitoma cutâneo canino proposto pelo ESVONC/VCS.

Estádio	**Tumor**	**Linfonodo regional**	**Metástase**
I	Único, <3cm, bem circunscrito	-	-
II	+1 nódulo, <3cm, com distância interlesional >10cm, bem circunscrito	-	-
III	1 ou +, >3cm, com distância interlesional <10cm, mal circunscrito ou ulcerado	-	-
IV	Qualquer tipo lesional	+	-
V	Qualquer tipo lesional	- ou +	+

Fonte: Adaptado de Daleck; Rocha; Ferreira, 2016.

Em um estudo mais recente realizado por Horta *et al.* (2018), foi proposto uma melhora no estadiamento definido pela OMS (Tabela 3).

Tabela 2 – Sistema de estadiamento clínico adaptado do sistema da OMS.

Estádio	**Descrição**
I	Tumor único, sem envolvimento do linfonodo
II	Múltiplos tumores (≥ 3), sem envolvimento do linfonodo
III	Tumor único, com envolvimento do linfonodo regional
IV	Tumor infiltrativo e grande, sem delimitação, ou tumores múltiplos (≥ 3), com envolvimento do linfonodo regional.
V	Qualquer tumor com metástase distante, incluindo invasão na medula óssea e a presença de mastócitos no sangue periférico.

Fonte:Adaptado de Horta *et al*., 2018.

No sistema proposto, pacientes com uma única lesão, com envolvimento do linfonodo, têm pior prognóstico do que aqueles pacientes com múltiplas lesões e sem o envolvimento do linfonodo regional. A localização do tumor (escroto, mucosa, prepúcio, vulva e períneo), certas raças, como o Sharpei, também sugerem um pior prognóstico (Horta *et al.*, 2018).

2.1.4 Cirurgia e margens cirúrgicas

A remoção cirúrgica ampla é indicada em alguns casos de MCTs, entretanto, embora sejam neoplasias macroscopicamente delimitadas, a microscopia tende a ir além das bordas palpáveis (Daleck; Rocha; Ferreira, 2016). Portanto, a recomendação, sempre que possível, é a realização de margens cirúrgicas de 3 cm laterais e de uma fáscia profunda para ressecção de MCTs em cães.

Entretanto, outros estudos recomendam margens menores do que essa recomendação tradicional (Selmic; Ruple, 2020). Em um estudo, 91% (21/23) dos cães que tiveram excisão completa em MCTs de grau I ou II com 2 cm de margens não apresentaram evidência de recorrência local superior a 538 dias (Fulcher *et al.*, 2006). Por outro lado, foi avaliada uma abordagem baseada na ressecção tumoral com margens laterais equivalentes ao seu diâmetro máximo e pelo menos um plano fascial profundo não acometido (Pratschke et al., 2013). Essa estratégia mostrou-se ser amplamente eficaz em MCTc graus I, II, III e subcutâneo. Nesse método, dos tumores removidos, 85% apresentaram margens limpas, e dentre os 15% com margens comprometidas, apenas um caso teve recorrência local em um período de 420 dias.

Recomenda-se que após a ressecção cirúrgica, todo tecido excisado deve ser enviado para a análise histopatológica. A identificação das margens laterais e profundas deve ser realizada corretamente para que o patologista possa detectar alguma área que a excisão não tenha sido completa (Daleck; Rocha; Ferreira, 2016).

Devido a liberação de heparina que causa uma deficiência na coagulação, um sangramento local maior pode ser visto durante a cirurgia e, mais raramente, no pós-operatório, inclusive com risco de deflagração da cascata de coagulação, síndrome da resposta inflamatória sistêmica e coagulação intravascular disseminada (Welle *et al.*, 2008).

O tempo de sobrevida em cães com MCT de acordo com o a graduação histológica tratados cirurgicamente varia de acordo com alguns estudos. De uma maneira geral, a sobrevida pós-operatória varia de 7 meses a 48 meses (Tabela 4).

Tabela 3 – Sobrevida de cães com tratamento cirúrgico de mastocitoma de acordo com o grau histológico (a) adaptado de London; Thamm (2020).

Estudo		N de cães	Porcentagem animais vivos	Meses P.O.	Sobrevida média (semanas)
BOSTOCK (1986)	Baixo grau	39	79	7	NR
	Grau intermediário	30	37	7	
	Alto grau	45	15	7	
PATNAIK (1969)	Baixo grau	30	83	48	
	Grau intermediário	36	44	48	
	Alto grau	17	6	48	
BOSTOCK (1992)	Baixo grau	19	90	NR	>40b
	Grau intermediário	16	75		>36
	Alto grau	15	27		13
MURPHY (2011)	Baixo grau	87	100	12	>80b
	Grau intermediário	199	92	12	>80
	Alto grau	54	46	12	40
SIMÕES (2005)	Baixo grau	33	91	20	NR
	Grau intermediário	35	71	20	
	Alto grau	19	42	20	

Fonte:Adaptado de London; Thamm (2020).

Legenda: NR, não reportado

a- Não está claro no estudo se a morte foi devido a metástase ou recidiva local.

b- Medianas não alcançadas no momento do último acompanhamento (ou seja, >50% vivo).

2.1.5 Graduação histopatológica e prognóstico

Na histopatologia, os MCTs são graduados através de duas classificações, o método de Patnaik *et al*. (1984) (Tabela 5) e de Kiupel *et al*. (2011) (Tabela 6). O método de Patnaik classifica os MCTs em grau I, II e III, sendo o III o mais indiferenciado e agressivo. Essa classificação segue diversas características histológicas, entretanto ela é subjetiva, podendo determinar diferentes graus para o mesmo tumor de acordo com diferentes patologistas, ocorrendo principalmente na diferenciação intermediária dos mastocitomas (grau II) (BOSTOCK *et al*., 1989). Devido a isso, foi proposto por Kiupel, um sistema mais simplificado, classificando os MCTs em “baixo grau” e “alto grau”.

Tabela 4 – Critérios histológicos para graduação de tumores de mastócitos segundo Patnaik *et al* (1984).

Graduação	**Critérios Histológicos**
I – Bem diferenciado	Células redondas monomórficas com citoplasma distinto, grânulos intracitoplasmáticos de tamanho médio, ausência de figuras de mitose. Grupos celulares compactos ou em linha confinados à derme.
II – Diferenciação intermediária	Presença de algumas células pleomórficas, redondas a ovoides; grânulos intracitoplasmáticos grandes e hipercromáticos, ou citoplasma distinto com grânulos finos. Figuras de mitose presentes (0 a 2 por campo em grande aumento). Áreas de edema ou necrose podem ser notadas. Infiltração do tumor à derme/tecido subcutâneo.
III – Pouco diferenciado ou indiferenciado	Camada densa de células pleomórficas, com citoplasma indistinto, com presença de poucos grânulos ou ausência destes. Figuras de mitose (3 a 6 por campo em grande aumento). Edema, hemorragia e necrose presentes. Infiltrado tumoral na derme/tecido subcutâneo.

Fonte: Patnaik *et al*. (1984).

Tabela 5 – Critérios para identificação de mastocitoma de alto grau, adaptado de Kiupel. *et al* (2011).

Alto Grau	≥ 7 figuras mitóticas em 10 campos de maior aumento;
Presença de qualquer um dos critérios de malignidade.	≥ 3 células multinucleadas (três ou mais núcleos) em 10 campos de maior aumento; ≥ 3 núcleos bizarros em 10 campos de maior aumento; Presença de cariomegalia em ≥ 2 campos.
Baixo Grau	Não possuir nenhum dos critérios de malignidade para alto grau.

Fonte: Adaptado de Kiupel *et al.* (2011).

Para estabelecer um diagnóstico diferencial com outras neoplasias de células redondas e para identificar granulação intracitoplasmática, especialmente nos casos em que grânulos citoplasmáticos são escassos, a utilização de algumas técnicas histoquímicas como azul de toluidina, Giemsa, e azul de Alcian-Safranina são de extrema importância. Entretanto, em alguns casos a imuno-histoquímica para confirmação diagnóstica pode ser necessária em MCTs pouco diferenciados (Simoes; Schoning, 1994).

Devido à variabilidade do comportamento biológico dos MCTc, estudos avaliando a ocorrência de metástases, a recorrência tumoral e o prognóstico frequentemente são realizados comparando as variáveis de diagnóstico com o desenvolvimento clínico e cirúrgico do MCT. Em um estudo realizado por Horta *et al.* (2018), a análise multivariada demonstrou um alto risco de morte (62%) relacionado ao MCT em pacientes com recorrência tumoral (distante ou local) e metástase em linfonodos. Nesse contexto, houve destaque na contagem mitótica, graduação histopatológica, uma alta expressão do Ki-67, KIT padrão III e duplicação tandem internas (ITD) no exon 11 de KIT. E na ausência desses fatores, o risco de morte diminuiu (4%).

Apesar dos estudos anteriores, não existe uma única técnica ou fator que pode definir o comportamento tumoral do MCT cutâneo. Devido a isso, De Nardi *et al.* (2022) recomendaram a avaliação combinada de diferentes fatores, incluindo histórico de recorrência tumoral, estadiamento clínico, graduação histopatológica (Kiupel e Patnaik), destacando a avaliação do nível do Ki-67, expressão de KIT e detecção de KIT, principalmente nos MCTs cutâneos de risco intermediário ao avançado (Kiupel; Camus, 2019). Os fatores prognósticos mais estudados e validados foram sumarizados na tabela 7.

Tabela 6 – Fatores prognósticos associados com o mastocitoma canino (MCT) adaptado de De Nardi *et al*. (2022).

Fatores prognósticos	Positivos	Negativos
Graduação histopatológica	Grau I - baixo grau	Grau III- alto grau
História de recorrência tumoral	Primeira apresentação clínica	Tumor recorrente
Tamanho tumoral	Maior diâmetro <3 cm	Maior diâmetro >3 cm
Metástases (regional e/ou distante)	Ausente	Presente
Margens cirúrgicas	Margens livres	Margens contaminadas
Contagem mitótica	<5 ou <7	>5 ou >7
Padrão KIT	KIT I	KIT II e III
Mutação c-KIT	Ausente	Presente
Índice de proliferação Ki-67	<23	>23

Fonte: De Nardi *et al.* (2022).

O fator prognóstico disponível para cães com MCT mais confiável e consistente no momento é a graduação histológica, embora o comportamento biológico de cada tumor talvez não possa ser previsto através dela (London; Thamm, 2020) e a combinação de mais de um método de classificação, como proposto por Krimer (2022), seja mais adequado.

2.1.6 Quimioterapia adjuvante

O uso da quimioterapia em cães com MCT tem como objetivo, prevenir ou retardar o surgimento de metástase após a cirurgia da ressecção do tumor primário, ou desacelerar a evolução de metástases já presentes (Blackwood *et al.*, 2012).

Como primeira-linha de tratamento, recomenda-se o uso da vimblastina (alcaloide da vinca) com prednisolona na dose de 2mg/m² uma vez por semana por quatro aplicações, seguida

de administrações quinzenais por mais quatro aplicações (Blackwood *et al.*, 2012; De Nardi *et al.*, 2022; Thamm; Mauldin; Vail, 1999). Nas primeiras duas semanas, administra-se prednisolona na dose de 2mg/kg, e então nas 10 semanas seguintes a dose é reduzida para 1mg/kg, devendo a medicação ser descontinuada ao final desse período (Stiborova *et al.*, 2019).

A vimblastina é potencialmente mielossupressora, principalmente no início do protocolo, o que é consistente com o efeito nadir do fármaco, enquanto os efeitos gastrointestinais costumam ser leves (Blackwood *et al.*, 2012; Soussa *et al.*, 2024). Em um estudo que comparou o uso do protocolo com vimblastina e prednisolona, associado ou não à radioterapia, observou-se que cerca de 23% dos animais do grupo sem radioterapia apresentaram neutropenia, não havendo diferença em relação ao grupo tratado com associação à radioterapia (Stiborova *et al.*, 2019).

A Lomustina é considerada um quimioterápico de segunda linha no tratamento do MCTc tem a indicação do uso da Lomustina (Blackwood *et al.*, 2012). A lomustina, também conhecida como ciclohexilcloroetilnitrosureia (CCNU), é um agente alquilante do grupo das nitrosureias, amplamente utilizada como quimioterapia oral devido ao seu perfil de boa tolerabilidade (London; Thamm, 2020). Um estudo avaliou a eficácia e segurança da lomustina (CCNU) em 23 cães com MCTc graus I, II e III. A maioria dos tumores eram cutâneos. Nesse estudo, os cães receberam a lomustina na dose de 90 mg/m² a cada três semanas. A resposta ao tratamento foi avaliada em 19 animais, dos quais 42% apresentaram redução do tumor, incluindo um caso com resposta completa e duradoura de 440 dias. A principal toxicidade observada foi neutropenia leve a moderada, ocorrendo aproximadamente uma semana após a administração da droga (Rassnick *et al.*, 1999). Outro estudo, com 15 cães com MCT de alto grau e completamente excisados, avaliou o uso da lomustina (70 mg/m2 a cada quatro semanas) combinada com a prednisona 0,5 a 1mg/kg diariamente. A mediana de sobrevida foi de 904 dias. Ao final do primeiro ano, nove animais cães permaneciam vivos, e após dois anos, seis ainda continuavam vivos (Hay; Larson, 2019).

Taylor *et al.* (2009) avaliaram a eficácia da combinação oral de clorambucil e prednisolona em cães com MCTc mensuráveis, inoperáveis e não indicados para radioterapia. Dos 21 animais incluídos, 13 com tumores de grau intermediário, seis de alto grau e dois diagnosticados apenas por citologia; oito apresentavam tumores múltiplos e seis tinham metástases linfonodais, sem metástases viscerais detectadas. A taxa de resposta foi de 38%, com três remissões completas e cinco parciais, enquanto nove cães apresentaram doença estável e quatro tiveram progressão. A taxa de resposta ao tratamento foi de 38%, com três casos de remissão completa e cinco de remissão parcial. O tempo mediano até a progressão nos cães que

responderam foi de 533 dias, enquanto a sobrevida mediana de todos os pacientes foi de 140 dias. Não houve influência significativa de variáveis como idade, sexo, peso, grau tumoral ou número de lesões sobre os desfechos clínicos, e o protocolo foi bem tolerado, sem evidência de toxicidade.

A quimioterapia metronômica pode ser uma alternativa como abordagem terapêutica, consistindo na administração de quimioterápicos em doses mais baixas do que a dose máxima tolerada, de forma contínua e em intervalos regulares, sem longas interrupções entre os ciclos (Browder *et al.*, 2000). Entretanto, há uma escassez de estudos comparando diferentes protocolos em cães portadores de MCTc. (Blackwood *et al.*, 2012).

2.1.7 Imunohistoquímica

A imunohistoquímica (IHQ) é um método auxiliar na confirmação do diagnóstico de MCT e auxilia na determinação do prognóstico tumoral. No MCTc, Ki-67 e KIT são amplamente utilizados. O Ki-67 é um marcador de proliferação celular, utilizado para o prognóstico (Strefezzi *et al.*, 2010; Webster *et al.*, 2007). As variações na expressão do KIT (CD117) em cães com cMCT através da IHQ foi descrito por Reguera *et al.* (2000) pela primeira vez. O padrão KIT é definido com base na sua marcação, e é dividido em três tipos (Kiupel *et al.*, 2004):

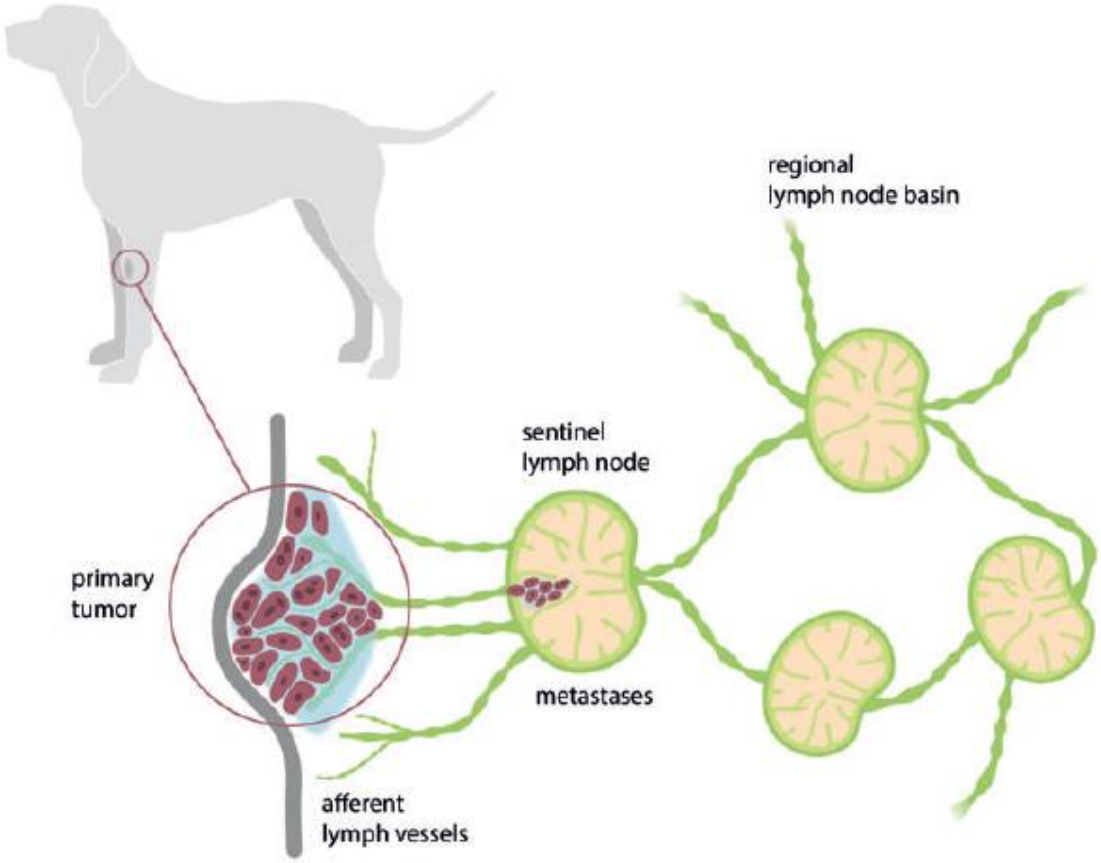
- Padrão KIT I: predominância perimembranosa na localização da proteína KIT, com mínima presença no citoplasma.
- Padrão KIT II: caracteriza-se por localização citoplasmática focal ou pontilhada da proteína KIT.
- Padrão KIT III: apresenta localização citoplasmática difusa da proteína KIT

Cães com cMCT grau I Patnaik apresentavam marcação fraca para KIT, de forma dispersa na membrana ou no citoplasma, e os cães com grau II ou III apresentavam uma maior marcação citoplasmática (Reguera *et al.*, 2000). Por fim, a localização de KIT na membrana parece mais adequada para prever tumores com menor risco de progressão da doença, enquanto que a detecção da mutação em c-Kit parece ser mais útil para identificar cMCT que são histologicamente de baixo grau, mas que são biologicamente agressivos (Thamm *et al.*, 2019).

2.2 LINFONODO SENTINELA E MAPEAMENTO LINFÁTICO

O linfonodo sentinela é o primeiro linfonodo que recebe a drenagem de um local anatômico (Figura 3) (Christiansen; Detmar, 2011), e logo após as células tumorais se deslocarem do tumor primário, ele será o primeiro local de alcance dessas células (Gould *et al.*, 1960). Possui a função de servir como local de reserva, em que as células tumorais podem se disseminar para outros locais, através dos vasos linfáticos, ducto torácico e sistema venoso (Ran *et al.*, 2010).

Figura 3 – Canino com tumor cutâneo em membro torácico e seu linfonodo sentinela



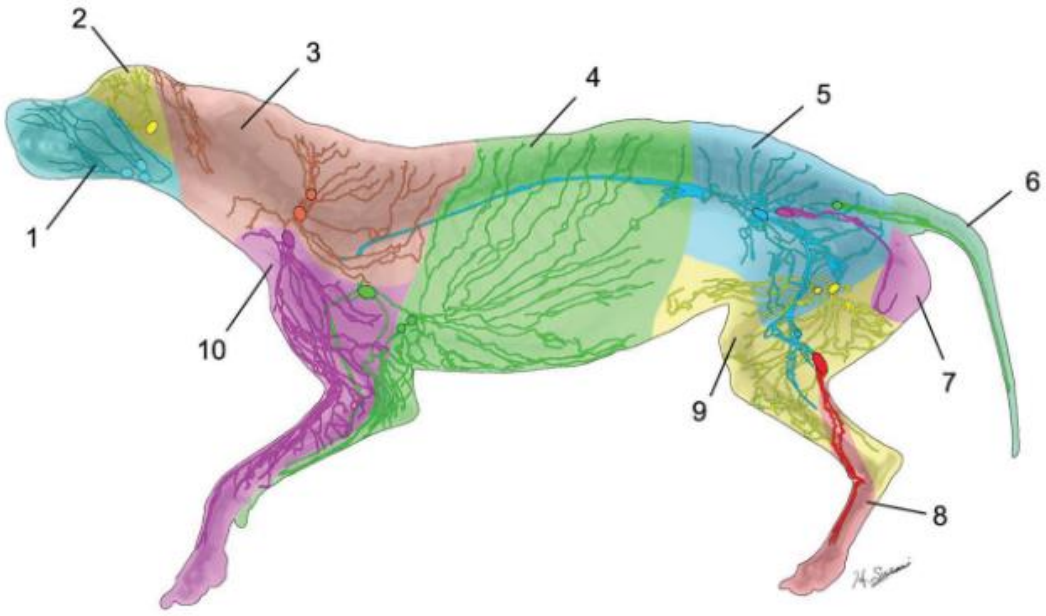
Fonte: Beer *et al.*, (2018).

A presença de metástase em cães com MCT canino é conhecida como um fator prognóstico negativo. Por muito tempo, a linfadenectomia foi controversa em pacientes em estágio II da doença, pois não se sabia sobre seu benefício terapêutico. Entretanto, alguns estudos têm demonstrado que a linfadenectomia tem valor terapêutico e melhora o prognóstico em pacientes que se encontram no grau II a qual passam por procedimento cirúrgico, mesmo sem quimioterapia adjuvante (Marconato *et al.*, 2018). Outro estudo, demonstrou que a linfadenectomia juntamente com a ressecção tumoral e o tratamento medicamentoso adjuvante aumentou a sobrevida e reduziu o tempo de progressão da doença em cães com MCTc de alto

grau (classificação de Kiupel) comparando com aqueles em que o linfonodo metastático não foi removido (Chalfon *et al.*, 2023). A evolução da doença é influenciada pela presença e extensão de metástases no linfonodo. O risco de desenvolvimento de metástase aumenta com a graduação histopatológica, devido ao fato de que quanto mais indiferenciado o tumor é, presume-se que mais células têm a capacidade de metastatizar (Kiupel *et al.*, 2011).

Suami *et al. (2013)* observaram 10 linfossomos (territórios linfáticos) nos caninos, sendo eles: submandibular, parotídeo, cervical superficial dorsal, axilar, ilíaco medial, sacral lateral, hipogástrico, poplíteo, inguinal superficial e cervical superficial ventral (Figura 4). Foi observada a formação colateral linfática após a linfadenectomia.

Figura 4 – Diagrama dos territórios linfáticos demonstrando os vasos linfáticos e seus linfonodos correspondentes.

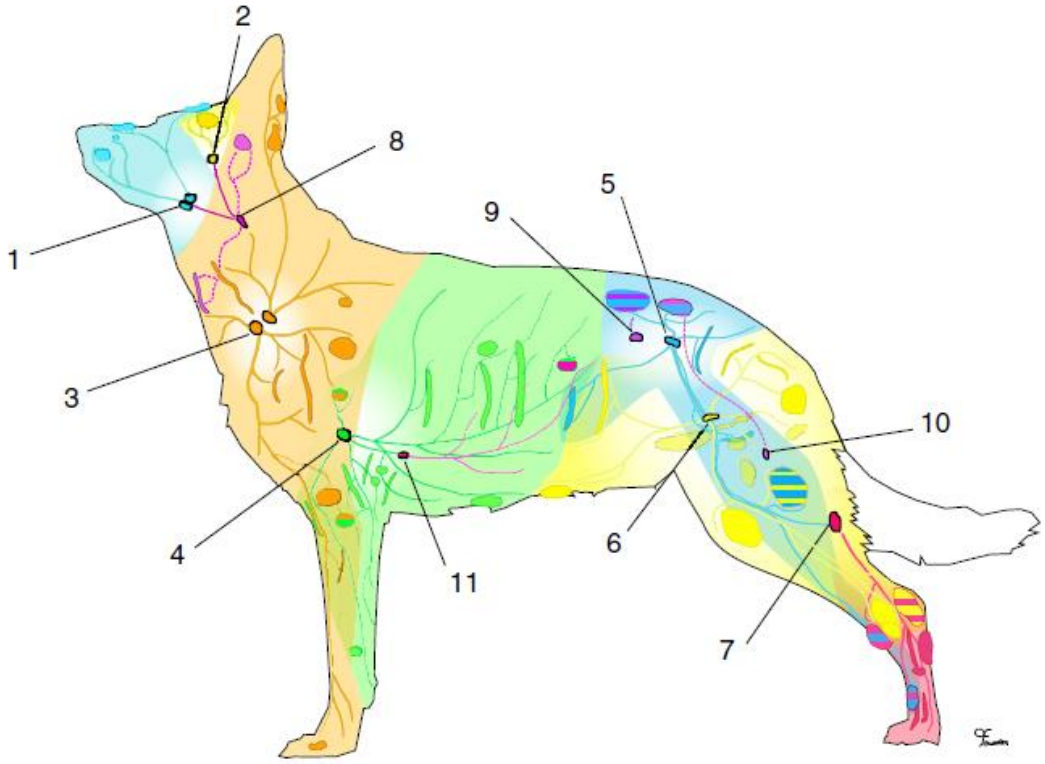


1- mandibular; 2 - parotideo; 3- cervical superficial dorsal ; 4 - axilar; 5- ilíaco medial; 6- sacral lateral; 7- hipogástrico ; 8 - popliteo; 9 – inguinal superficial; 10- cervical superficial ventral.). Fonte: adaptado de (Suami *et al.*, 2013).

Um estudo utilizando a técnica de ultrassonografia contrastada demonstrou algumas áreas de ambiguidade e outros locais atípicos na drenagem linfática de 59 MCTs de cães (Fournier *et al.*, 2021). As neoplasias tiveram as cores conforme o seu linfonodo sentinela, e o linfossomo do linfonodo esperado foi representado em cores. As “zonas de ambiguidade” foram demonstradas entre o LN cervical superficial e o axilar no membro torácico; o tronco entre o

axilar, inguinal superficial e ilíaco medial; e o membro pélvico entre o inguinal superficial, ilíaco medial e poplíteo. Alguns linfonodos sentinelas foram identificados como aberrantes em 5 MCTs sendo eles retrofaríngeo medial, cólico, femoral e ilíaco medial (Figura 5).

Figura 5 – Mastocitoma e sua associação com a área de drenagem linfática.



1- mandibular (turquesa), 2- parotídeo (amarelo), 3- Cervical superficial (laranja), 4- axilar (verde), 5- ilíaco medial (azul), 6- inguinal superficial(amarelo), 7- poplíteo(vermelho), 8- retrofaríngeo medial (malva), 9- cólico (roxo), 10- femoral (rosa), 11- axilar acessório (rubi). Linfonodos sentinelas aberrantes (linha pontilhada). Fonte: adaptado de Fournier *et al.* (2021).

Inúmeras técnicas têm sido descritas no mapeamento do linfonodo sentinela em MCT na medicina veterinária, dentre elas, o ultrassom, linfocintilografia (Ferrari *et al.*, 2020; Worley, 2014) e linfangiografia indireta por tomografia computadorizada (Grimes *et al.*, 2020). Algumas dessas técnicas, possuem desvantagens como a necessidade de anestesia geral, possuir custo elevado, e múltiplos escaneamentos que devem ser realizados para detectar corretamente os vasos linfáticos e o SLN.

2.2.1 Citologia do linfonodo

A palpação do linfonodo não é um método eficaz para predizer metástase linfonodal, pois linfonodos de tamanho normal e não palpáveis podem conter metástases (Ferrari *et al.*,

2018). Diante disso outros estudos são necessários para a avaliação do linfonodo sentinela. A avaliação citológica dos linfonodos em cães com mastocitoma cutâneo pode ser difícil, devido à falta de critérios padronizados a qual consigam diferenciar mastócitos reativos de metastáticos, diminuindo o valor prognóstico no estadiamento de cães com mastocitoma. Devido a isso, Krick *et al.* (2009) propuseram um critério citológico (Tabela 8) para avaliar a doença metastática de mastócitos em linfonodos regionais. Os linfonodos foram categorizados em cinco grupos: normais, com hiperplasia linfoide reativa, com indícios de possível metástase, com características sugestivas de provável metástase e aqueles com metástase confirmada.

Tabela 7 – Critério citológico para a determinação de doença metastática de mastócitos nos linfonodos regionais.

Interpretação	Descrição
Normal	Sem visualizações de mastócitos
Hiperplasia linfoide reativa	Mais de 50% de pequenos linfócitos com uma população mista de pró-linfócitos, linfoblastos, plasmócitos e/ou poucos a moderados macrófagos, neutrófilos e eosinófilos, e/ou raros mastócitos individuais.
Possível metástase	Em pelo menos uma lâmina, duas a três ocorrências de mastócitos em agregados de duas a três células.
Provável metástase	Em pelo menos uma lâmina, mais de três focos de mastócitos em agregados de duas a três células e/ou dois a cinco agregados de mais de três mastócitos.
Metástase certa	Em pelo menos uma lâmina, substituição do tecido linfoide por mastócitos e/ou presença de mastócitos agrupados, pouco diferenciados, com pleomorfismo, anisocitose, anisocariose e/ou granulação reduzida ou variável, e ou mais de cinco agregados de mais de três mastócitos.

Fonte: Krick *et al*. (2009).

Um estudo retrospectivo multicêntrico comparou os critérios citológicos (Krick *et al.*, 2009) com a classificação histopatológica (Weishaar *et al.*, 2014) para a detecção de metástases em linfonodos regionais. Além disso, o trabalho avaliou se a citologia corada com Wright-Giemsa modificado (WGS) poderia apresentar melhor desempenho do que a histologia convencional com hematoxilina-eosina (HE) na identificação precoce de linfonodos metastáticos (Escoda Llorens *et al.*, 2025). Os resultados demonstraram que os critérios citológicos de Krick apresentam bom desempenho no diagnóstico, especialmente nos casos classificados como metástases certas, embora seja necessária cautela para interpretação dos casos possíveis ou prováveis. Diante das limitações da histologia rotineira com HE para a detecção de metástases iniciais, reforça-se a relevância da utilização do azul de toluidina para uma avaliação nodal mais precisa (Escoda Llorens *et al.*, 2025). Assim, a citologia, embora prática e confiável como método de triagem no estadiamento de mastocitomas cutâneos caninos, deve ser empregada em conjunto com a avaliação histopatológica, a graduação tumoral e técnicas avançadas de mapeamento linfonodal para subsidiar a tomada de decisão clínica.

2.2.3 Histopatologia do linfonodo

A avaliação citológica tem sido associada com uma alta taxa de resultados falsos-negativos e falsos-positivos, assim como a palpação do linfonodo em cães com MCT apresenta valor limitado na predição de metástases (Baginski; Davis; Bastian, 2014; Ku; Kass; Christopher, 2017; Langenbach *et al.*, 2001). Assim, a avaliação histopatológica tem sido considerada o padrão-ouro para o diagnóstico de metástases em linfonodo em casos de cães com mastocitoma cutâneo canino. Em um estudo envolvendo 93 cães submetidos a exérese tumoral e linfadenectomia dos linfonodos não palpáveis ou de tamanho normal, aproximadamente 60% dos linfonodos apresentaram envolvimento metastático (HN1-HN2-HN3), sendo que a presença de metástases esteve significativamente associada a tumores com diâmetro superior a 3cm. Tais achados sustentam a recomendação de linfadenectomia mesmo na ausência de alterações clínicas, visando um estadiamento mais acurado e possível impacto terapêutico (Ferrari *et al.*, 2018; Stefanello *et al.*, 2024).

Segundo De Nardi *et al* (2022) a recomendação da avaliação histopatológica do linfonodo, foram as seguintes: secções seriadas desse linfonodo, do eixo transversal ao maior e com cada secção de 2 mm de espessura, com a finalidade de representar a maior área possível dos seios subcapsulares e do parênquima do linfonodo, e com uma atenção especial a invasão extra-capsular e capsular. As técnicas de azul de toluidina e análise imuno-histoquímica podem

ser adicionadas com o objetivo de melhorar a eficácia do diagnóstico. A utilização do corante metacromático azul de toluidina é recomendado para a avaliação do linfonodo, devido à hematoxilina e eosina (HE) não ser confiável para a avaliação de metástases precoces (Sabattini *et al.*, 2022). Um sistema de classificação foi proposto para a avaliação de metástases no linfonodo (Weishaar *et al.*, 2014) , a qual divide os casos da seguinte forma:

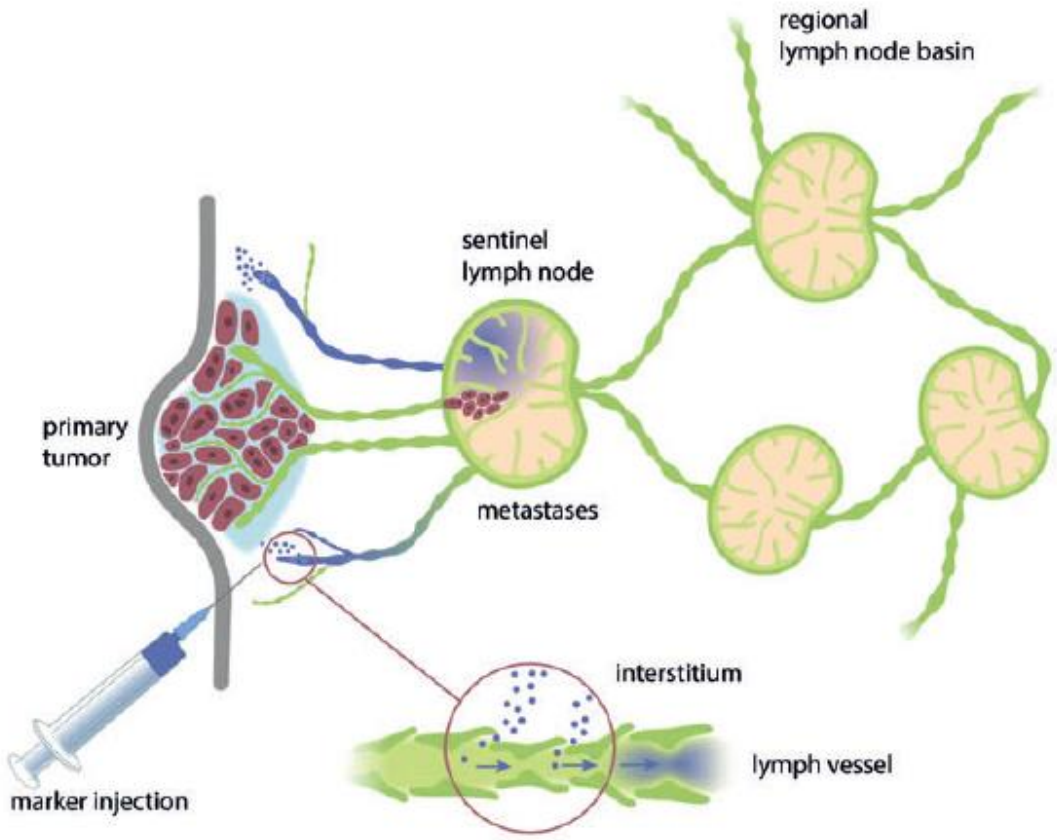
- HN0 (linfonodo não metastático): caracterizado pela ausência ou mastócitos raros (0-3), isolado nos seios (paracortical, subcapsular ou medular), e/ou parênquima do linfonodo por campo de 40X.
- HN1 (linfonodo pré-metastático): caracterizado por mais de três mastócitos isolados nos seios (subcapsular, paracortical, ou medular), e/ou parênquima do linfonodo por campo de 40x, em pelo menos quatro campos.
- HN2 (metástase inicial): caracterizado por agregados(clusters) de mastócitos (mais de três células) nos seios (paracortical, subcapsular ou medular) e/ou parênquima, ou cordões sinusoidais de mastócitos.
- HN3 (metástase ostensiva): caracterizado pela alteração da arquitetura do linfonodo, com focos de mastócitos organizados em um cordão ou manto.

O termo pré-metastático utilizado na classificação HN1 é controverso, pois pode ser confundido com casos de metástases pré-estabelecidas (De Nardi *et al.*, 2022).

2.4.4 Mapeamento com azul de metileno intraoperatório

Na medicina, o corante azul de metileno é considerado um corante seguro, sendo usado pela via intravenosa para diagnosticar adenoma de paratireoide (Nour, 2004). Alguns corantes azuis têm sido utilizados na medicina veterinária, dentre eles tem-se destaque para o uso dos corantes azul patente e o azul de metileno (Chiti *et al.*, 2023; Zanardi *et al.*, 2025). Durante o mapeamento linfático com corante azul patente (Figura 6), a substância é cuidadosamente injetada nos quatro quadrantes em torno do tumor, evitando colocá-la diretamente no tecido tumoral. O corante é então absorvido pelos vasos linfáticos afluentes e transportado até o linfonodo sentinela (Beer *et al.*, 2018) . Já foi verificado que o uso do azul de metileno a 2% para detecção do linfonodo sentinela em cães, pela via intradérmica na região periareolar da mama torácica cranial teve eficácia de 76,27% para a identificação do linfonodo axilar, e as vantagens da utilização deste corante é o seu baixo custo, a aplicação simples e a facilidade de acesso (Maués *et al.*, 2016).

Figura 6 – Desenho esquemático demonstrando a cadeia linfática após injeção peritumoral de azul patente



Fonte: Adaptado de (Beer *et al.*, 2018).

Alguns estudos demonstram um risco baixo de reações cutâneas quando o azul de metileno é injetado através da via intradérmica em humanos, incluindo necrose dermal (Bézu et al., 2011; Stradling; Aranha; Gabram, 2002). Entretanto, em um estudo que utilizou o mesmo corante em cães com MCT, o autor não observou nenhum desses riscos relatados. Nesse mesmo estudo, o resultado do mapeamento do SLN impactou na recomendação da terapia adjuvante recomendada, que de outra forma não teria sido oferecida caso esse paciente não tivesse a avaliação do linfonodo. Esse estudo também demonstrou que oito de 19 cães (42%) tiveram os SLNs diferentes dos RLN (Worley, 2014).

2.4.5 Linfangiografia indireta radiográfica

A linfografia indireta é definida como o depósito de um contraste na periferia do vaso linfático, com a ideia desse contraste ser absorvido pelo sistema linfático para observação por meio de exames de imagem (Wisner; Seibert; Katzberg, 1998). O uso de um contraste lipossolúvel ou hidrossolúvel é um método simples e tem sido utilizado para investigação da

drenagem linfática de muitos órgãos e tecidos. Simulando o fluxo linfático natural quando injetado *in vivo*, demonstrando os vasos linfáticos eferentes e para quais linfonodos eles irão drenar (Collivignarelli *et al.*, 2021). Alguns estudos têm utilizado um contraste lipossolúvel, o lipiodol, um óleo iodado, a qual é injetado peritumoral através da via intradérmica ou na submucosa, permitindo a identificação do suposto linfonodo sentinela de determinada área, realçando o linfonodo em até 24 horas após a injeção através da radiografia (Brissot; Edery, 2017; Collivignarelli *et al.*, 2021).

Um estudo recente demonstrou que a linfangiografia indireta utilizando o lipiodol foi uma técnica eficaz para mapear o SLN em cães com mastocitoma. Demonstrando que mais do que um linfonodo pode estar envolvido e que o padrão de drenagem linfática pode ser diferente para cada MCT, mas demonstrou que poucos SLN podem ter uma localização diferente do RLN em cães com mastocitoma. Entretanto, uma das limitações do estudo foi a ausência da realização de procedimento intraoperatório, como por exemplo injeção de azul de metileno para ajudar na detecção do SLN identificado através do estudo radiográfico utilizando o lipiodol. Devido a isso não foi possível confirmar se os SLNs removidos cirurgicamente ou com citologia coincidiram com os linfonodos que foram destacados na radiografia indireta (De Bonis *et al.*, 2022). As vantagens na utilização do lipiodol é a possibilidade de realizar com o cão acordado ou levemente sedado, a segurança desse meio de contraste quando injetado na periferia do tumor e da ampla disponibilidade de radiologia (Collivignarelli *et al.*, 2021).

3 OBJETIVOS

Comparar, em cães com mastocitoma cutâneo, a capacidade da linfografia indireta com lipiodol (IL) e do azul de metileno (MB), isoladas e em combinação (IL+MB), para mapear o linfonodo sentinela (SLN) e identificar metástase, além de descrever segurança nas técnicas e e morbidade.

Nossa hipótese é que, ao combinar a definição anatômica pré-operatória (IL) com o rastreamento intraoperatório (MB):

- A detecção por tumor com IL será igual ou superior à do MB, sem perda de especificidade para distinguir linfonodos metastáticos (HN2–HN3) de não-metastáticos (HN0–HN1).
- A combinação (IL+MB) aumentará a identificação de drenagens complementares e de SLNS adicionais, elevando a chance de encontrar ≥1 SLN metastático por tumor em relação a cada técnica isoladamente.

4 MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os material e métodos, resultados, discussão e conclusão serão apresentados na forma de artigo científico, o qual será submetido ao periódico *Veterinary and Comparative Oncology* como artigo original.

5 ARTIGO

Comparative Study of Methylene Blue and Lipiodol for Sentinel Lymph Node Mapping in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors

Jéssica Francielle Camargo[a*], Simone Passos Bianchi[a], Haiumy Garcia Cardozo[a], Caroline Soares Ferreira[a], Gabriela Foppa[a], Rodrigo dos Santos Horta[b], Priscila Beatriz da Silva Serpa[c], Stella de Faria Valle[d].

[a] Veterinary Teaching Hospital, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

[b] Department of Clinical and Veterinary Surgery, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil.

[c] Department of Population Medicine and Diagnostic Sciences, Cornell University, Ithaca, NY, USA.

[d] Departament of Veterinary Clinical Pathology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

*Corresponding author. Jéssica Francielle Camargo, Veterinary Teaching Hospital, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Av. Bento Gonçalves 9090, Brazil. CEP 91540-000, Brazil mobile: +55 51 980147911. E-mail address: jessicavetcamargo@gmail.com (Camargo, J.F).

Abstract

Canine cutaneous mast cell tumor (cMCT) is one of the most common skin neoplasms in dogs, with lymph nodes representing the primary route of metastasis. Accurate sentinel lymph node (SLN) identification is therefore essential for staging and treatment planning. This study

evaluated indirect lipiodol lymphography (IL) and intraoperative methylene blue (MB) mapping in 21 dogs, including 26 tumors and 38 excised lymph nodes, to assess SLN detection and its association with tumor characteristics and nodal status. MB identified 34 SLNs, whereas IL detected 29. Compared with the expected regional lymph node (RLN), MB correctly identified 76.9% of nodes, while IL identified 61.5%. The combined use of both techniques increased concordance with the RLN to 84.6%, demonstrating their complementary value. MB detected additional axillary nodes, whereas IL aided in identifying some inguinal nodes. Larger tumors were more frequently associated with incomplete surgical margins and higher nodal histologic grades, indicating an increased risk of metastasis. Importantly, 19% of tumors drained to at least one SLN outside the expected regional basin, highlighting lymphatic anatomical variability. The absence of IL opacification did not exclude clinically relevant nodes, as MB identified all such cases, including HN0–HN2 nodes. Although MB stained some non-metastatic nodes, it provided useful intraoperative guidance. Adverse events were uncommon, with two transient reactions after IL and none after MB, and postoperative morbidity was low (13.2%; 5/38). Overall, MB offered higher detection rates, while IL improved anatomical delineation. Their combined use optimized SLN mapping and staging accuracy in canine

Keywords: Mast cell tumor; Lymphatic Metastasis; Lymphadenectomy; Oncology.

Introduction

Canine cutaneous mast cell tumors (cMCTs) are among the most common skin neoplasms in dogs, accounting for approximately 16% to 21% of all diagnosed cutaneous tumors in these species (Strefezzi et al. 2009). The sentinel lymph node (SLN) is the first lymph node to receive metastatic cells from a solid tumor and is therefore usually the first site where tumor cells migrate after leaving the primary tumor. However, the SLN may be located in

anatomically atypical sites and may not be correspond to the expected regional lymph node (RLN) (Gould et al. 1960; Christiansen and Detmar 2011; Worley 2014). In human oncology, it is well documented that selective lymphadenectomy can result in less pain and reduced postoperative morbidity (Veronesi et al. 2003). In dogs with cMCT, the removal of metastatic SLNs has been associated with improved prognostic outcome (Sabattini et al. 2021; Chalfon et al. 2022).

Over recent decades, methods for identifying nodal metastasis in canine mast cell tumors (MCTs) have improved, with several techniques described in the literature for both preoperative and intraoperative detection (Brissot and Edery 2017; Collivignarelli et al. 2021; Zanardi et al. 2025). Lymphatic fluid is colorless, which makes intraoperatively identification of lymphatic vessels difficult without the use of dyes (Suami 2017).

A previous study demonstrated the efficacy of indirect lymphangiography with lipiodol in mapping the SLN in dogs with cMCT, including evidence that multiple lymph nodes may be involved and that the lymphatic drainage pattern vary among tumors (De Bonis et al. 2022). However, one limitation described was the lack of intraoperative confirmation using dyes, making it impossible to verify whether the lymph nodes identified radiographically corresponded to those removed during surgery. To address this gap, we aimed to quantify how preoperative iodized-oil lymphangiography (Lipiodol; IL) and intraoperative methylene blue (MB) mapping complement each other in identifying SLNs in cMCT, and to determine whether a single-modality protocol is justifiable when resources are limited. We hypothesized that MB could be a cost-effective adjunct to preoperative Lipiodol mapping, improving real-time lymph node identification without increasing morbidity.

MATERIAL AND METHODS

Study Design and Case Selection

This prospective study was approved by the Ethics Committee on Animal Use from Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), under protocol number 43437. Written informed consent was obtained from all owners before enrollment. All clinical evaluations and therapeutic procedures followed standard-of-care practices and were not influenced by study participation. No additional interventions or discomfort were imposed for research purposes. Exclusions criteria included non-resectable tumors; prior surgery or scar tissue near the tumor or the expected SLN basin; neoadjuvant, ongoing, or previous chemotherapy; hypersensitivity to contrast agents; renal disease; concurrent tumors; or a history of neoplasia within the previous five years.

A total of 21 client-owned dogs diagnosed cMCTs were prospectively enrolled at the Veterinary Teaching Hospital between August 2023 and February 2025. As some dogs presented with multiple cMCTs, 26 tumors were evaluated across the study population, resulting in the excision of 38 lymph nodes. Dogs of any breed, sex, or age were eligible, provided they met the predefined inclusion and exclusion criteria.

All dogs underwent a standardized staging protocol, which included oncological clinical evaluation, comprehensive physical examination, fine-needle aspiration biopsy (FNA) with cytological assessment for tumor triage, complete blood count, serum biochemical analysis, abdominal ultrasonography, and three-view thoracic radiography.

Indirect lymphography

For dogs eligible and selected for surgery, SLN identification was performed using iodized oil (IO; Lipiodol Ultra-Fluid, iodized ethyl-esters of the fatty acids of poppy seed oil, iodine 480 mg/mL; Guerbet Ltda, Brazil). The contrast agent was injected intradermally using a 25 G needle attached to a 1 mL syringe in the four quadrants surrounding the tumor,

approximately 0.5 to 1 cm from the tumor margins. The procedure followed a protocol previously described (Collivignarelli et al. 2021). A volume of 0.4 mL was slowly injected into each quadrant, adjusted according to tumor size, over 1–2 minutes. After injection, the site was gently massaged to facilitate lymphatic drainage, with particular care taken to avoid intravascular administration of the contrast agent. In certain cases, due to tumor size, promethazine was administered as premedication at a dose of 0.2 mg/kg prior to contrast injection to prevent mast cell degranulation. Animals were closely monitored for 10 minutes after injection for any signs of adverse reactions.

Three radiographic projections were obtained 24 hours after contrast administration to optimize visualization of the SLN, considering the tumor's anatomical location and the expected lymphatic drainage pathway. The SLN was identified based on these projections. For tumors located in the abdominal region, some dogs were recommended to fast prior to imaging to improve visualization of the contrast-enhanced lymph node.

Intraoperative SLN mapping with MB and surgical procedure

Patients were referred to the general surgery service and anesthetized according to individualized protocols based on physical status classification. Anesthetic monitoring was performed continuously following institutional guidelines.

Subsequently, 0.5 mL of sterile methylene blue (MB; 5 mg/mL; Renylab, Brazil) was injected intradermally into four peritumoral quadrants using a 3 mL syringe and a 25 G needle. After a 30-minute diffusion period, SLN excision (lymphadenectomy) was performed before the tumor excision to avoid seeding neoplastic cells to the LN sites. All contrasted-enhanced and/or blue-stained SLNs were accessed for lymphadenectomy. When SLN mapping could not be achieved due to the absence of both contrast and dye, a non-selective dissection of the RLN

was performed, following the anatomical distribution of lymphatic territories previously described in normal dogs (Suami et al. 2013). Lymphadenectomy was performed using sharp and blunt dissection. The blood vessels of the lymph nodes were ligated using 3-0 polydioxanone (PDS; Bioline, Brazil) or coagulated using an electrosurgical device.

Tumor excision was then performed with lateral surgical margins of 2 to 3 cm and one fascial plane in depth. However, after margins assessment, it was observed that 2-3 cm margins were insufficient for complete excision in some cases. Therefore, an intraoperative biopsy was performed when necessary. Lateral margins were demarcated using a dermatographic pen (Texta 700; Texta, Brazil). In some cases, intraoperative biopsies were performed, whereas in others, tumor samples were submitted directly for routine histopathological analysis using surgical inks of different colors (yellow, black, and green), following the protocol previously described (Kamstock et al. 2011). The use of surgical ink aimed to assist in sample orientation, facilitating visual identification of margins both macroscopically and microscopically, and highlighting areas of particular concern.

Both excised tumor tissues and lymph nodes were measured and fixed in 10% neutral buffered formalin for subsequent histopathological analysis at the Veterinary Pathology Laboratory of UFRGS.

The diagnosis of cMCT was confirmed histologically according to the Patnaik three-tier grading system (Patnaik et al. 1984) and the Kiupel two-tier grading system (Kiupel et al. 2011). The presence of lymph node metastasis was assessed and classified according to the HN system (Weishaar et al. 2014). Surgical margins were classified as incomplete when neoplastic mast cells were present at the cut edge of the specimen and complete when no neoplastic cells were detected at the margin (histologic tumor-free margin >0mm).

Statistical Analysis

Age, weight, and tumor size were presented as mean ± SD or median (IQR) after assessment of normality using the Shapiro-Wilk test. Categorical data are presented as count and percentages. Outcomes are described in terms of detection and complication rates, with exact 95% confidence intervals (95% CI). IL and MB were evaluated in the same tumors and compared using McNemar's test. Agreement is reported as percent agreement and Cohen's kappa with 95% CI. Associations between categorical variables (e.g., tumor size group and nodal metastasis, margin width and completeness) were analyzed using Fisher's exact test. Continuous two-group comparisons were assessed using the t-test or the Mann–Whitney U test. Analyses were conducted per tumor; however, one tumor per dog (the largest tumor) was used for the size–metastasis analysis. All tests were two-sided with $\alpha = 0.05$ and were conducted in R (R Core Team, 2025).

RESULTS

Patient demographics and tumor characteristics

Twenty-one dogs completed the study. Table 1 summarizes the characteristics of the animals included in the study, as well as their tumor locations. Ten breeds were represented, including eight mixed-breed dogs and two Golden Retrievers; other breeds represented by a single dog included the Pug, Fox Terrier, French Bulldog, Pinscher, Labrador Retriever, Bernese Mountain Dog, and Rottweiler. The median age of the dogs included in this study was 9.5 years (range 5 - 13 years). Fourteen female and four male dogs were included in this study.

The most prevalent tumor sites were the trunk (11 cases, 42.3%) and thoracic limb (8 cases, 30.8%), followed by the pelvic limb (4 cases, 15.4%), head and neck (2 cases, 7.7%), and perineal region (1 case, 3.8%).

171 **Table 1.** Demographics and tumor characteristics of 21 dogs with cutaneous mast cell
172 tumors (cMCT) undergoing sentinel lymph node (SLN) mapping using iodized oil (IO) and
173 methylene blue (MB).
174

Characteristic	Value (%)
Breed	
Mixed Breed	11 (52.4)
Golden Retriever	2 (9.5)
Bernese Mountain Dog	1 (4.8)
Dachshund	1 (4.8)
Fox Terrier	1 (4.8)
French Bulldog	1 (4.8)
Labrador Retriever	1 (4.8)
Pinscher	1 (4.8)
Pug	1 (4.8)
Rottweiler	1 (4.8)
Sex	
Female	17 (81%)
Male	4 (19%)
Bodyweight	18.9 ± 12.7 kg (range, 4.2–47.0 kg)
Age	9.5 ± 2.1 years (range, 5–13 years)
MCT location	
Head/neck	2 (7.7%)

Characteristic	Value (%)
Breed	
Trunk	11 (42.3%)
Forelimb	8 (30.8%)
Hindlimb	4 (15.4%)
Perineal	1 (3.8%)

Abbreviations: MCT (mast cell tumor)

Indirect lymphography mapping

In most cases, surgical excision could not be performed immediately following IO injection, and surgery was therefore performed five to seven days after contrast administration. Post-injection changes (>24 hours), such as transient hyperemia and occasional nodule enlargement, were observed. Three animals (Figure 1) exhibited an adverse reaction (after two weeks) at the site of IO administration, which was managed by surgically removal of the affected tissue. Histopathological examination of the excised tissue revealed focal lymphoplasmacytic dermatitis. No dog exhibited an immediate reaction to the peritumoral injection of IO.



Figure 1. Local reaction was seen 24 hours after peritumoral intradermal injection of iodized oil (Lipiodol). (A) White arrow: injection papule/entry point. (B) Localized gray discoloration; black arrows indicate areas with a necrotic appearance (compatible with superficial epidermal necrosis).

A total of 29 SLNs were identified in 26 tumors using IO. Among the 21 dogs with 26 tumors, lipiodol allowed detection of the SLNs in 16 dogs (21 tumors). In five tumors (19.2%), no contrasted-enhanced SLN was detected, even after repeating the injection. Eight tumors presented more than one SLN. The number of SLN per dog ranged from 0 to 3, with a mean of 1.15 ± 0.78 and a median of 1. Among the tumors with detectable nodes, most had a single SLN (61.9%, n=13), followed by two nodes (33.3%, n=7) and three nodes (4.8%, n=1) (Figure 2).

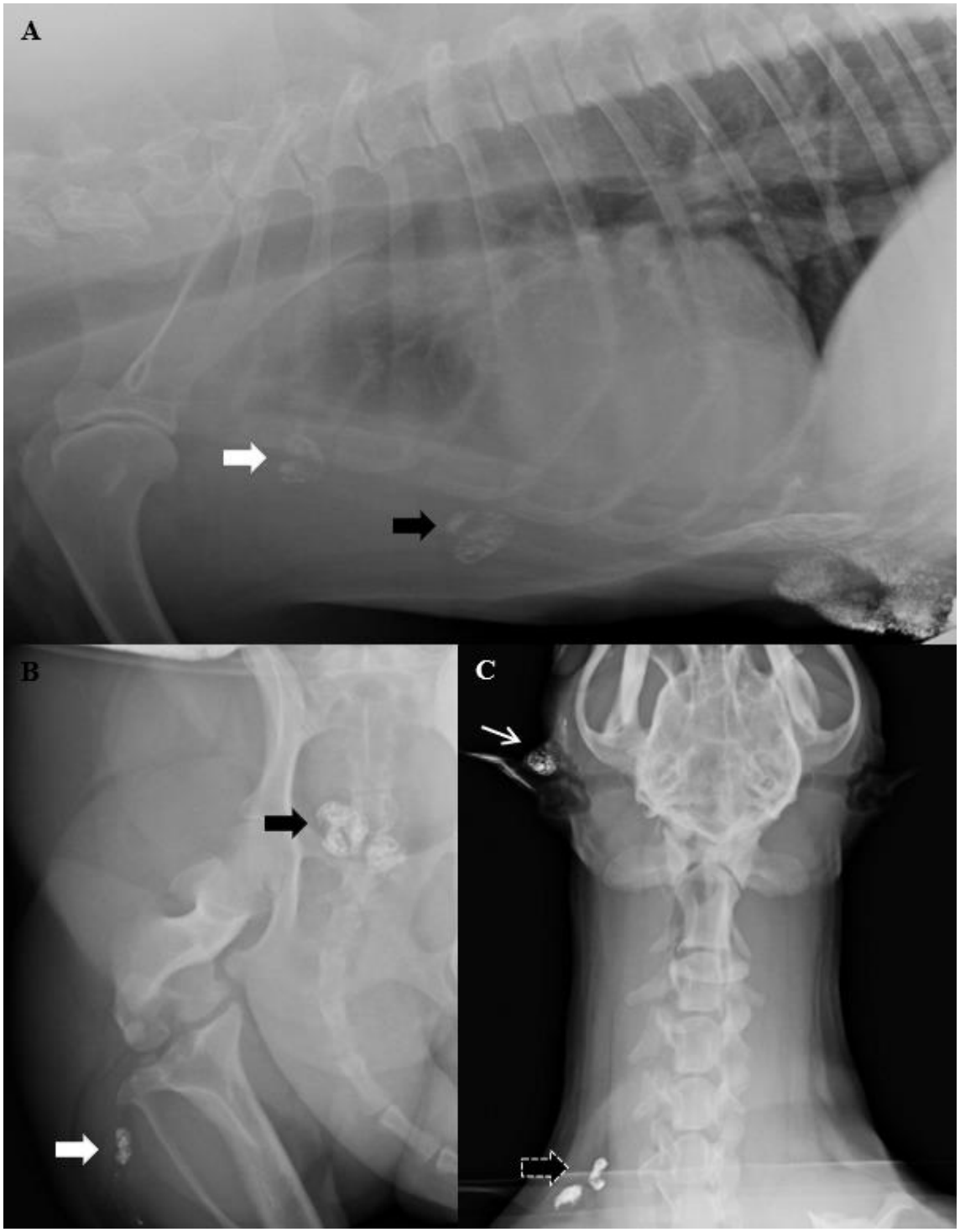


Figure 2. Radiographic lymphography in dogs. (A) Two lymph nodes after IL in the mammary region: black arrowhead, accessory axillary LN; white arrowhead, axillary LN. (B) Three lymph nodes visualized: white arrowhead, popliteal LN; black arrowhead, two superficial inguinal LNs. (C) Two lymph nodes after Lipiodol injection in the ear pinna: dotted black arrowhead, ventral and dorsal superficial cervical LNs.

Intraoperative methylene blue colorimetric mapping

A total of 34 SLNs were detected in 26 tumors using MB. Among the 21 dogs with 26 tumors, MB enabled detection of the SLN in 19 dogs (24 tumors). Dye uptake could only be confirmed during surgical exposure of the lymph nodes. In some dogs, a small amount of dye was visible through the skin; however, it was not possible to determine exactly which nodes were stained. SLN localization was guided by lipiodol lymphography, and during surgery the nodes identified by lipiodol were carefully examined for MB staining.

In two tumors (7.7%), no SLN was detected. The number of SLNs per tumor ranged from 0 to 3, with a mean of 1.31 ± 0.74 and a median of 1. Among tumors with at least one SLN detected (n = 24), 16 (66.7%) had a single SLN, 6 (25.0%) had two SLNs, and 2 (8.3%) had three SLNs. In the five tumors in which no contrasted-enhanced SLN was identified with IL, the sentinel node identified intraoperatively using MB was consistently the axillary lymph node, totaling six LN (one dog had two axillary LN). Methylene blue highlighted the lymphatic vessels and SLNs, which showed variable staining intensity (Figure 3).

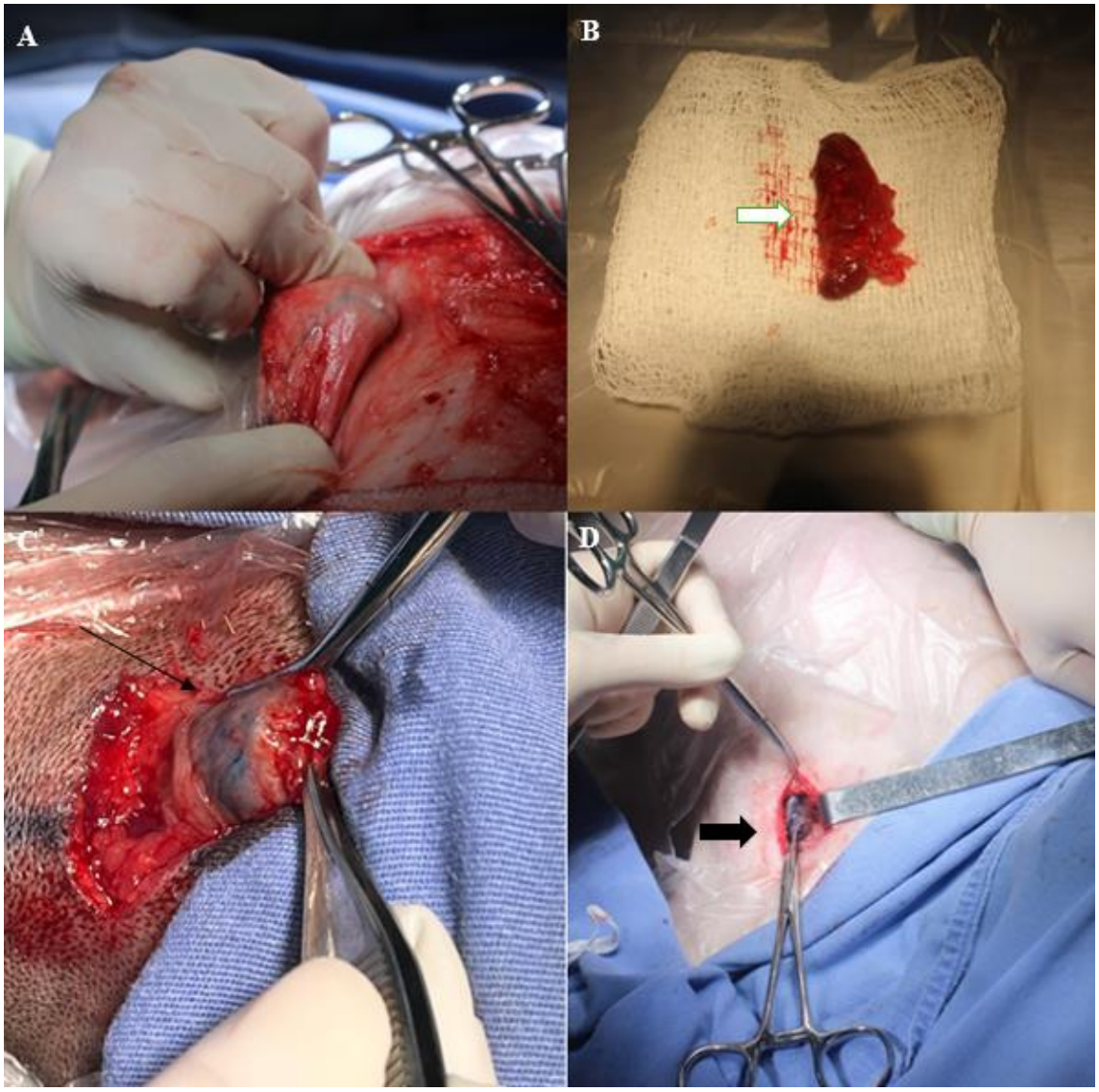


Figure 3. Lymphatic mapping with methylene blue in dogs. (A) Visualization of lymphatic vessels stained with blue dye. (B) White arrow: unstained sentinel lymph node. (C) Arrow: faintly stained sentinel lymph node. (D) Black arrow: intensely stained sentinel lymph node.

The dogs were monitored for the first two weeks after the procedure. None showed blue discoloration of the urine or mucous membranes, and no adverse reactions to methylene blue were observed.

Surgical procedure

In the present study, 21 animals underwent surgical resection of the tumor and the corresponding LNs, resulting in the excision of 38 lymph nodes. In some cases (n = 4), none of the evaluated techniques (IL or MB) detected the LN. Two dogs (9.5%) showed lipiodol uptake in the medial iliac LNs; however, these LNs were not excised due to the owner's refusal to allow additional intervention. In three cases, intraoperative electrochemotherapy was performed because adequate surgical margins could not be achieved. Two thoracic-limb wounds developed dehisced with necrosis and were managed by open wound management. No systemic adverse effects were observed.

Surgical margins were evaluated in 19 of 21 dogs (13 intraoperatively and 6 postoperatively); two limb amputations were excluded. During surgery, 7 of 13 (53.8%; 95% CI, 25.1–80.8) showed incomplete margins. Tumors with incomplete margins were larger (median 4.0 cm) than those with complete margins (median 1.5 cm; Mann–Whitney $U = 32.5$, $p = 0.018$; $r = 0.70$). Among cases with documented margin width, incomplete margins occurred in 2 of 2 excisions with 2 cm margins and 5 of 11 (45%) with 3 cm margins ($p = 0.462$), indicating limited statistical power. On postoperative histopathology, 5 of 6 cases had incomplete margins (four despite 3 cm margins); the only complete excision was observed in the smallest tumor (0.7 cm). Overall, larger tumors were more often incompletely excised, and no significant difference was observed between 2 and 3 cm margins in this small sample.

A total of 38 lymph nodes were removed, and most of the excised SLN were located in the inguinal and axillary lymphocenters. Complications following lymphadenectomy occurred in five cases, most frequently in the superficial cervical region (Table 2). Two additional axillary LNs were excised based on clinical judgment rather than SLN mapping (no lipiodol uptake, no methylene-blue staining). Both were classified as HN1 on histopathology and were therefore not counted as SLNs; excluding them does not alter the study estimates.

Complications at the primary tumor site occurred in five dogs, predominantly wound dehiscence.

Table 2. Incidence of lymph node complications in dogs with cutaneous mast cell tumor (n=21 animals; 38 lymph nodes)

Sentinel lymphocenter	Total excised lymph node	Complication	Incidence
Superficial cervical	10	2	20%
Popliteal	3	1	33,3%
Inguinal	14	1	7,14%
Axillary / accessory axillary	11	1	9,1%
Total	38	5	-

Agreement of IL and MB

A total of 26 tumors were evaluated in 21 animals. Among these tumors, detection rates were 80.8% with IL (21/26; 95% CI, 60.6–93.4) and 92.3% with MB (24/26; 95% CI, 74.9–99.1), with no statistically significant difference between techniques ($p = 0.453$). Considering concordance as the presence of at least one shared lymphatic drainage territory per tumor, the two methods agreed in 19 of 26 cases (73.1%).

IL detected a total of 29 LNs, whereas MB 34 SLNs. Although MB detected slightly more metastatic nodes overall (HN2–HN3), both methods showed a broadly similar distribution across grades. In relation to dogs, SLN metastasis (HN2–HN3) was identified in 12 of 21 dogs

(57.1%). A total of 38 lymph nodes where analyzed, of which 18/38 (47.4%; 95% CI, 31.0–64.2) were metastatic (HN2=15, HN3=3).

To evaluate the association between primary tumor size and the presence of lymph node metastasis, one tumor per dog was considered (for dogs with multiple tumors, the largest tumor was selected). Tumors were divided into three groups according to maximum diameter: ≤2 cm, >2 to ≤3 cm, and >3 cm. Metastatic involvement (HN2/HN3) occurred in 3/10 (30%) dogs with tumors ≤2 cm, 3/3 (100%) with tumors >2 to ≤3 cm, and 6/8 (75%) with tumors >3 cm. Fisher's exact test showed a significant difference among groups ($p = 0.048$), indicating a positive association between tumor size and nodal metastasis (Table 3). Mean primary tumor size increased with higher nodal grades (HN0: 1.5 cm; HN1: 3.07 cm; HN2: 3.59 cm; HN3: 3.82 cm).

Table 3. Association between tumor size and lymph node metastasis (HN2/HN3) in dogs with cMCT.

Tumor Size Group	Total Dogs	HN2/HN3 n (%)	HN0/HN1 n (%)
≤ 2 cm	10	3 (30)	7(70)
> 2 and ≤ 3 cm	3	3 (100)	0(0)
> 3 cm	8	6 (75)	2(25)
Total	21	12 (57.1)	9(42.9)

Concordance with the expected RLN (Suami et al., 2013) was 76.9% (20/26; 95% CI, 56.4–91.0) for MB and 61.5% (16/26; 95% CI, 40.6–79.8) for IL; when considering the union of both methods, RLN concordance increased to 84.6% (22/26). The two methods were concordant in 16/26 cases (61.5%) meaning they identified identical SLN sets. MB identified more SLNs verall than IL (34 vs. 29 across 26 tumors) and, in the axillary basin, mapped six

289 SLNs in five dogs, whereas IL did not identify any. IL identified more than one SLN in 8 of 26
290 tumors (30.7%) (Table 4).

291 Descriptive frequency analysis revealed that both LN status and surgical margin pattern
292 influenced chemotherapy recommendations, although in different ways. Among dogs with
293 complete margins, 6 of 9 (66.7%) were recommended to receive adjuvant therapy, whereas this
294 proportion increased to 9 of 10 (90.0%) among those with incomplete margins. Considering
295 LN status, none of the animals classified as HN0 were recommended for chemotherapy, while
296 the frequency progressively increased in the other groups: 57.1% in HN1, 71.4% in HN2, and
297 100% in HN3. Overall, margin status influenced recommendations, but LN involvement was
298 the more consistent determinant of clinical management.

299

300 Table 4. Regional lymph node (Suami et al. 2013), tumor location, and sentinel lymph node
301 (SLN) in dogs with cMCT

DOG#	TUMOR LOCATION	REGIONAL LN (SUAMI)	SLN – IL	SLN – MB
1	trunk	Axillary	none	Axillary (HN1)
2	pinna	Medial retropharyngeal	superficial cervical (2) (HN1)	superficial cervical (2) (HN1)
3A	hindlimb (digit)	Superficial inguinal	popliteal, right inguinal (2) (HN2)	popliteal, right inguinal (2) (HN2)
3B	lateral thorax	Axillary	none	Axillary(HN2)

4	forelimb (digit)	Superficial cervical	superficial cervical (2) (HN2)	superficial cervical (2) (HN2)
5	perivulvar	Medial iliac	right inguinal(HN3)	right inguinal (HN3)
6	hindlimb	Inguinal	Popliteal(HN2),inguinal (HN1)	Popliteal(HN2), inguinal (HN1)
7	abdomen	Inguinal	Inguinal (HN1) (2)	inguinal (HN1) (2)
8	elbow	Axillary	superficial cervical (HN1)	superficial cervical (HN1)
9	elbow	Axillary	superficial cervical (HN2)	superficial cervical (HN2)
10	radius	Superficial cervical	superficial cervical (HN2)	superficial cervical (HN2)
11	caudal abdomen	Inguinal	Inguinal (HN2)	none
12A	tarsus	Inguinal	Inguinal (HN0), popliteal (HN0)	Inguinal(HN0)
12B	lateral thorax	Axillary	Axillary (HN1)	Axillary (HN1)
13A	caudal abdomen	Inguinal	Inguinal (HN2)	Inguinal (HN2)
13B	caudal abdomen	Inguinal	Inguinal (HN2)	Inguinal (HN2)

14	thorax	Axillary	none	Axillary (HN0)
15A	near axilla	Axillary	superficial cervical(HN1)	superficial cervical (HN1), axillary(HN2), accessory axillary (HN1)
15B	left abdominal side	Inguinal	Inguinal (HN3)	Inguinal (HN3)
16A	right abdominal side	Inguinal	inguinal (2) (HN2)	inguinal (2) (HN2)
16B	neck	Superficial cervical	superficial cervical (HN1)	superficial cervical (HN1)
17	hindlimb	Inguinal	Inguinal (HN3)	none
18	radius	Superficial cervical	Axillary (HN0), superficial cervical(HN1)	superficial cervical (HN1)
19	near axilla	Axillary	axillary	Axillary (HN2)
20	near axilla	Axillary	none	Axillary (HN1)
21	cranial abdomen	Axillary	none	axillary (2) (HN1)
		Totals (SLNs detected)	**29**	**34**

Abbreviations: RLN = regional lymph node; SLN = sentinel lymph node.

DISCUSSION

The results of the present study support previous data regarding the epidemiology of cMCT. The mean age of 9.5 years was similar to the reported median of 8-9 years with cMCT. Another similarity was the anatomical distribution of tumors, with the trunk and limbs being the most affected regions. In our study these locations accounted for 42.3% (trunk) and 46.3% (limbs) of cases (Rodríguez et al. 2023). Mixed-breed dogs were the predominant group (38.1%), followed by Golden Retrievers (n = 2). This distribution is consistent with previous studies indicating that the mixed-breed dogs are among the most commonly cMCT-affected groups (Pierini et al. 2020; Stefanello et al. 2024), although the Golden Retriever have also been described as a breed predisposed to this neoplasm (Arendt et al. 2015; Biasoli et al. 2019).

Tumor size showed a clear association with the likelihood of incomplete surgical margins. Larger tumors were significantly more often associated with incomplete margins, corroborating previous reports that identified tumor size as a major predictor of surgical outcome. Some studies suggest that the vast majority of grade I and II cMCTs can be completely excised when resected with a 2 cm lateral margin and one deep fascial plane (Fulcher et al. 2006). In addition, a modified proportional margins approach has been proposed for cMCT (Pratschke et al. 2013; Saunders et al. 2021). Because the optimal margin likely varies according to tumor size, location, histologic grade, and the need for planned adjuvant therapy, it remains uncertain; therefore, margin decisions should be individualized and supported by histopathology evaluation.

Our results showed a significant association between larger tumor size and LN metastasis. Metastatic involvement was more frequent in larger tumors, and mean tumor size increased progressively with higher nodal grades (HN0: 1.5 cm; HN1: 3.07 cm; HN2: 3.59 cm; HN3: 3.82 cm). Similar findings were previously described (Ferrari et al. 2018) and observed that MCTs greater than 3 cm were frequently associated with metastatic LNs. From a clinical perspective, these findings reinforces the importance of careful LN evaluation in patients

presenting with larger lesions, as they may warrant more aggressive staging strategies and closer postoperative monitoring.

While lipiodol detected SLNs in 80.8% (21/26) of tumors, methylene blue showed a higher detection rate, identifying SLNs in 92.3% (24/26). Similarly, a previous study reported a success rate of 89.6% for lipiodol in dogs with MCTs (De Bonis et al. 2022). However, a key limitation of that study was the absence of intraoperative confirmation of SLN identification, which may have influenced the reported outcomes. In contrast, in the present study both techniques were applied in the same tumors, allowing direct comparison between methods.

Although methylene blue showed a slightly higher detection rate, lipiodol provided valuable preoperative anatomical information regarding lymphatic drainage patterns. This is particularly relevant because lymphatic drainage in cMCT may be variable and may not always correspond to the expected regional lymph node. The radiographic mapping provided by lipiodol allowed surgeons to anticipate the location of potential sentinel nodes, facilitating surgical planning and targeted exploration.

The concordance between the two techniques was 73.1%, indicating that both methods frequently identified the same lymphatic drainage pathways, particularly in superficial cervical and inguinal lymph nodes. However, each method also identified nodes that were not detected by the other, highlighting their complementary nature. Methylene blue was particularly useful intraoperatively for real-time identification of lymphatic vessels and nodes, whereas lipiodol contributed to preoperative mapping and improved anatomical orientation during surgery.

From a clinical perspective, these findings suggest that combining both techniques may optimize SLN detection and staging accuracy in dogs with cMCT. However, in situations where access to imaging resources is limited, methylene blue alone may represent a practical and cost-effective alternative for intraoperative SLN identification. Conversely, when available,

preoperative lipiodol lymphography may enhance surgical planning and increase the likelihood of identifying atypical lymphatic drainage pathways. Therefore, the choice of technique may depend on available resources, surgical expertise, and the clinical context.

Besides the moderate agreement between the two techniques, SLN metastasis (HN2-HN3) occurred in 12 of 21 dogs (57.1%), a proportion higher than that reported in previous studies, which described rates of approximately 50% (Ferrari et al. 2018; Stefanello et al. 2024). In previous studies, regional LNs were often evaluated based on proximity rather than true SLN mapping, although combined approaches have also been described, such as preoperatively lymphoscintigraphy followed by intraoperative MB injection guided by a gamma probe. Our combined IL and MB approach may improve the detection of clinically meaningful nodal metastasis compared with strategies based solely on removal of the expected regional LN.

In our study, discordance between expected RLN and SLN occurred in 5 dogs, and 19% (5/26) of tumors had at least one additional SLN. This contrasts with previous findings reporting that up to 42% of dogs with cMCT may have an SLN different from the expected RLN (Worley 2014).

Methylene blue demonstrated greater sensitivity, detecting axillary nodes in 5 of 26 tumors that were not identified by lipiodol. Conversely, lipiodol identified inguinal nodes in 2 of 26 tumors that were not detected by MB. These findings supports previous studies suggesting that MB can be used as a single technique, with staining observed in approximately 88% of dogs and a consistent association between stained LNs and metastatic involvement (Zanardi et al. 2025). However, IL revealed alternative or multiple lymphatic drainage pathways that were not detected by MB, which may influence the tumor staging. Thus, while MB is simple to use and widely accessible in settings with limited resources, combining both techniques appears to improve mapping accuracy by identifying both expected SLNs and additional lymphatic drainage pathways. Notably, in our study MB also stained non-metastatic nodes (HN0), which

379 contrasts with previous reports in which only metastatic nodes (HN2/HN3) were stained,
380 whereas unstained nodes were classified as non-metastatic (HN0/HN1)(Zanardi et al. 2025).

381 In five tumors, the IL failed to opacify SLN. In three cases, the IL injection was
382 repeated, whereas in the remaining two cases reinjection was not possible because postponing
383 the surgical procedure was not considered appropriate. Similarly, one study reported failure to
384 detect SLN on the initial attempt in some patients, requiring a second contrast injection
385 (Fournier et al. 2021). Interestingly, all failures in our study involved axillary SLNs. This
386 observation suggests that anatomical factors, such as complex thoracic lymphatic drainage,
387 superimposition with bony structures, or local adipose tissue volume that may impair contrast
388 diffusion or radiographic delineation. In addition, technical factors such as insufficient contrast
389 volume or accidental subcutaneous rather than intradermal injection may also have limited
390 nodal opacification. In these cases, all SLNs were identified using MB, and four were classified
391 as HN1 (pre-metastatic). Thus, lack of opacification on IL did not exclude the presence of SLNs
392 or clinically relevant nodal alterations. This finding is consistent with a previous study in which,
393 in 17% of cases, SLNs were localized by tracking contrasted-enhanced lymphatic channels
394 rather than by direct nodal uptake (Lapsley et al. 2021). Although metastatic obstruction of
395 lymphatic flow can prevent nodal opacification (Soultani et al. 2017), this mechanism is more
396 consistent with advanced disease and is therefore less likely to explain the predominantly HN1
397 findings observed in the present study.

398 From a biological perspective, tumor biology likely plays a central role in these findings.
399 In canine mast cell tumors, early lymphatic dissemination may occur before significant
400 structural disruption of lymphatic vessels or lymph nodes becomes evident, allowing partial
401 preservation of lymphatic drainage during the initial stages of disease (Krick et al. 2009;
402 Weishaar et al. 2014). In addition, tumor-associated changes in lymphatic function and
403 interstitial pressure may further influence lymphatic flow dynamics, even in the absence of

404 overt metastasis (Mortimer and Rockson 2014). Patient-related factors may also contribute to
405 mapping variability. In particular, increased adipose tissue may not only interfere mechanically
406 with contrast diffusion and imaging but has also been associated with reduced SLN detection
407 rates, possibly due to altered lymphatic function and increased interstitial resistance (Insalaco
408 et al. 2024).

409 Few adverse reactions were observed, occurring in three cases and characterized by a
410 local response within 24 hours after IL administration, marked by erythema and
411 histopathological evidence of lymphoplasmacytic dermatitis. These changes resolved following
412 surgical excision of the affected skin. Similarly, erythema and swelling at the injection site have
413 been reported in up to 50% of cases, typically occurring 2-4 weeks after indirect
414 lymphangiography (Mayer et al. 2013). Although the reactions observed in the present study
415 occurred earlier and resolved without additional complications, both findings indicate that
416 localized inflammatory responses may occur after lipiodol injection. This is likely related to its
417 oil-based nature, which can lead to local tissue irritation, a mild foreign body–type reaction,
418 and prolonged retention within lymphatic vessels, contributing to a transient inflammatory
419 response (Lee et al. 2014; Sugiyama et al. 2024). However, these reactions are generally self-
420 limiting, indicating that IL remains a safe technique. In contrast, no adverse effects were
421 associated with MB in the present study.Only five animals developed mild postoperative
422 complications, which seroma, lymphedema, and lameness. Seroma formation may be attributed
423 to the accumulation of serous fluid within surgical dead space, resulting from disruption of
424 lymphatic and vascular structures during tissue dissection, while lymphedema is likely
425 associated with transient impairment of lymphatic drainage following lymph node removal.
426 Lameness may be explained by local inflammation, tissue manipulation, or temporary
427 discomfort related to the surgical procedure (Fossum 2019; Kuroi et al. 2006; Mortimer and
428 Rockson 2014). These complications were transient and resolved within a few days after

surgery, either spontaneously in most cases or with supportive corticosteroid therapy. The overall incidence of postoperative morbidity was 13.2% (5/38), which is consistent with previous studies reporting a low frequency of complications (21.2%) associated with lymphadenectomy (Chiti et al. 2023; Mattioli et al. 2025). The combination of lipiodol with MB facilitates the visualization of the LN in relation to the surrounding tissues, thereby reducing the extent of manipulation and anatomical dissection, as well as surgical morbidity for the patient, in agreement with the literature. Therefore, lymphadenectomy of peripheral LNs appears to be a safe technique that can be readily performed in most cases.

The limitations of the study include the small sample size, variability in tumor locations, and the lack of randomization and blinding. These factors may influence the generalizability of the results. Prospective, multicenter studies that standardize injection protocols and compare mapping strategies on patient-level outcomes, such as local control, disease-free survival, and overall survival, are warranted.

Conclusion

To conclude, in SLN mapping for cMCT, MB achieved a higher detection rate than lipiodol relative to the expected regional basin (76.9% vs 61.5%), while the combination of both techniques improved anatomical delineation by revealing complementary lymphatic drainage patterns (MB detecting additional axillary LN; IL identifying some inguinal LNs). Concordance with the expected regional LNs basin increased to 84.6% when both techniques were considered together, and only 19% of tumors had additional SLN outside the expected regional basin. Importantly, lack of opacification with IL did not rule out clinically relevant SLNs, and MB staining was not perfectly specific for metastasis. Adverse effects were

uncommon and mild, and postoperative morbidity after lymphadenectomy was low, supporting the safety and practicality of this approach.

Acknowledgments

We dedicate this work to the memory of Dr. Emerson Antonio Contesini, whose guidance, knowledge, and enthusiasm were instrumental to the development of this study. Dr. Contesini served as MPO mentor and advisor during JFC Master's and doctoral research, and although he passed away before this work, his scientific commitment continues to inspire us. We are deeply grateful for his invaluable contributions and enduring legacy.

Funding

This study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Finance Code 001. Author J.F.C received research support from CAPES.

Ethical approval

This study was performed in line with the principles of the CONCEA. Approval was granted by the Ethics Committee of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (43437).

Competing interests

The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

Authors contributions

All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by Jessica Francielle Camargo, Stella de Faria Valle and Rodrigo Horta. The first draft of the manuscript was written by Jessica Francielle Carmargo and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript."

REFERENCES

Arendt ML, Melin M, Tonomura N, et al (2015) Genome-Wide Association Study of Golden Retrievers Identifies Germ-Line Risk Factors Predisposing to Mast Cell Tumours. PLoS Genet 11:e1005647. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005647

Biasoli D, Compston-Garnett L, Ricketts SL, et al (2019) A synonymous germline variant in a gene encoding a cell adhesion molecule is associated with cutaneous mast cell tumour development in Labrador and Golden Retrievers. PLoS Genet 15:e1007967. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007967

Brissot HN, Edery EG (2017) Use of indirect lymphography to identify sentinel lymph node in dogs: a pilot study in 30 tumours. Vet Comparative Oncology 15:740–753. https://doi.org/10.1111/vco.12214

Chalfon C, Sabattini S, Finotello R, et al (2022) Lymphadenectomy improves outcome in dogs with resected Kiupel high-grade cutaneous mast cell tumours and overtly metastatic regional lymph nodes. J of Small Animal Practice 63:661–669. https://doi.org/10.1111/jsap.13525

Chiti LE, Gariboldi EM, Ferrari R, et al (2023) Surgical complications following sentinel lymph node biopsy guided by γ-probe and methylene blue in 113 tumour-bearing dogs. Vet Comparative Oncology 21:62–72. https://doi.org/10.1111/vco.12861

Christiansen A, Detmar M (2011) Lymphangiogenesis and Cancer. Genes & Cancer 2:1146–1158. https://doi.org/10.1177/1947601911423028

Collivignarelli F, Tamburro R, Aste G, et al (2021) Lymphatic Drainage Mapping with Indirect Lymphography for Canine Mammary Tumors. Animals 11:1115. https://doi.org/10.3390/ani11041115

De Bonis A, Collivignarelli F, Paolini A, et al (2022) Sentinel Lymph Node Mapping with Indirect Lymphangiography for Canine Mast Cell Tumour. Veterinary Sciences 9:484. https://doi.org/10.3390/vetsci9090484

Ferrari R, Marconato L, Buracco P, et al (2018) The impact of extirpation of non-palpable/normal-sized regional lymph nodes on staging of canine cutaneous mast cell tumours: A multicentric retrospective study. Vet Comparative Oncology 16:505–510. https://doi.org/10.1111/vco.12408

Fournier Q, Thierry F, Longo M, et al (2021) Contrast-enhanced ultrasound for sentinel lymph node mapping in the routine staging of canine mast cell tumours: A feasibility study. Vet Comparative Oncology 19:451–462. https://doi.org/10.1111/vco.12647

Fossum TW (2019) *Small Animal Surgery*, 5th edn. Elsevier, St. Louis

Fulcher RP, Ludwig LL, Bergman PJ, et al (2006) Evaluation of a two-centimeter lateral surgical margin for excision of grade I and grade II cutaneous mast cell tumors in dogs.

517 Journal of the American Veterinary Medical Association 228:210–215.
518 https://doi.org/10.2460/javma.228.2.210

519 Gould EA, Winship T, Philbin PH, Kerr HH (1960) Observations on a “sentinel node” in
520 cancer of the parotid. Cancer 13:77–78. https://doi.org/10.1002/1097-
521 0142(196001/02)13:1%253C77::AID-CNCR2820130114%253E3.0.CO;2-D

522 Mortimer PS, Rockson SG. New developments in clinical aspects of lymphatic disease. *J Clin*
523 *Invest.* 2014;124(3):915–921. doi:10.1172/JCI71603

524 Kamstock DA, Ehrhart EJ, Getzy DM, et al (2011) Recommended Guidelines for Submission,
525 Trimming, Margin Evaluation, and Reporting of Tumor Biopsy Specimens in Veterinary
526 Surgical Pathology. Vet Pathol 48:19–31. https://doi.org/10.1177/0300985810389316

527 Kiupel M, Webster JD, Bailey KL, et al (2011) Proposal of a 2-Tier Histologic Grading
528 System for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors to More Accurately Predict Biological
529 Behavior

530 Kuroi K, Shimozuma K, Taguchi T, et al (2006) Pathophysiology of seroma in breast cancer.
531 *Breast Cancer* 13:272–279. https://doi.org/10.2325/jbcs.13.272

532 Krick EL, Billings AP, Shofer FS, Watanabe S, Sorenmo KU (2009)
533 Cytological lymph node evaluation in dogs with mast cell tumours: association with grade and
534 survival. *Veterinary and Comparative Oncology* 7(2):130–138.doi:10.1111/j.1476-
535 5829.2009.00194.x

536

537 Lapsley J, Hayes GM, Janvier V, et al (2021) Influence of locoregional lymph node aspiration
538 cytology vs sentinel lymph node mapping and biopsy on disease stage assignment in dogs

539 with integumentary mast cell tumors. Veterinary Surgery 50:133–141.
540 https://doi.org/10.1111/vsu.13537

541 Lee EW, Shin JH, Ko HK, Gwon DI, Yoon HK, Sung KB (2014) Lymphangiography to treat
542 postoperative lymphatic leakage: a technical review. Korean J Radiol 15:724–732.
543 https://doi.org/10.3348/kjr.2014.15.6.724

544

545 Mattioli G, Cino M, Stefanello D, et al (2025) Peripheral sentinel lymphadenectomy in 163
546 dogs: Postoperative surgical complications and comparison between intraoperative dissection
547 techniques. Veterinary Surgery 54:766–776. https://doi.org/10.1111/vsu.14246

548 Mayer MN, Silver TI, Lowe CK, Anthony JM (2013) Radiographic lymphangiographyin the
549 dog using iodized oil. Vet Comparative Oncology 11:151–161.
550 https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2012.00334.x

551 Mortimer PS, Rockson SG (2014) New developments in clinical aspects of lymphatic disease.
552 *J Clin Invest* 124:915–921. https://doi.org/10.1172/JCI71608

553 Patnaik AK, Ehler WJ, MacEwen EG (1984) Canine Cutaneous Mast Cell Tumor:
554 Morphologic Grading and Survival Time in 83 Dogs. Vet Pathol 21:469–474.
555 https://doi.org/10.1177/030098588402100503

556 Pierini A, Marchetti V, Rossanese M, et al (2020) Ultrasound-Guided Hook-Wire
557 Localization for Surgical Excision of Non-Palpable Superficial Inguinal Lymph Nodes in
558 Dogs: A Pilot Study. Animals 10:2314. https://doi.org/10.3390/ani10122314

559 Pratschke KM, Atherton MJ, Sillito JA, Lamm CG (2013) Evaluation of a modified
560 proportional margins approach for surgical resection of mast cell tumors in dogs: 40 cases
561 (2008–2012). javma 243:1436–1441. https://doi.org/10.2460/javma.243.10.1436

562 Rodríguez J, Santana Á, Borzollino MA, et al (2023) Epidemiology of canine cutaneous
563 round cell tumours on the canary archipelago in Spain. Vet Comparative Oncology 21:406–
564 418. https://doi.org/10.1111/vco.12899

565 Sabattini S, Kiupel M, Finotello R, et al (2021) A retrospective study on prophylactic regional
566 lymphadenectomy versus nodal observation only in the management of dogs with stage I,
567 completely resected, low-grade cutaneous mast cell tumors

568 Saunders H, Thomson MJ, O'Connell K, et al (2021) Evaluation of a modified proportional
569 margin approach for complete surgical excision of canine cutaneous mast cell tumours and its
570 association with clinical outcome. Vet Comparative Oncology 19:604–615.
571 https://doi.org/10.1111/vco.12630

572 Soultani C, Patsikas MN, Karayannopoulou M, et al (2017). Assessment of sentinel lymph
573 node metastasis in canine mammary gland tumors using computed tomographic indirect
574 lymphography. Vet Radiology Ultrasound 58:186–196. https://doi.org/10.1111/vru.12460

575 Stefanello D, Gariboldi EM, Boracchi P, et al (2024) Weishaar's classification system for
576 nodal metastasis in sentinel lymph nodes: Clinical outcome in 94 dogs with mast cell tumor.
577 Veterinary Internal Medicne 38:1675–1685. https://doi.org/10.1111/jvim.16997

578 Strefezzi RF, Kleeb SR, Xavier JG, Catão-Dias JL (2009) Prognostic indicators for mast cell
579 tumors. Brazilian Journal of Veterinary Pathology 2:110–121

580 Suami H (2017) Lymphosome concept: Anatomical study of the lymphatic system. Journal of
581 Surgical Oncology 115:13–17. https://doi.org/10.1002/jso.24332

582 Suami H, Yamashita S, Soto-Miranda MA, Chang DW (2013) Lymphatic Territories
583 (Lymphosomes) in a Canine: An Animal Model for Investigation of Postoperative Lymphatic
584 Alterations. PLoS ONE 8:1–9. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069222

585 Sugiyama S, Hara K, Tanioka H, Yamaguchi T, Takahashi M (2024) Ultrasound-guided
586 intranodal lymphangiography with lipiodol: clinical applications and outcomes. J Dent Sci
587 19:688–694. https://doi.org/10.1016/j.jds.2023.09.015

588 Veronesi U, Luini A, Intra M, et al (2003) A Randomized Comparison of Sentinel-Node
589 Biopsy with Routine Axillary Dissection in Breast Cancer. n engl j med

590 Weishaar KM, Thamm DH, Worley DR, Kamstock DA (2014) Correlation of Nodal Mast
591 Cells with Clinical Outcome in Dogs with Mast Cell Tumour and a Proposed Classification
592 System for the Evaluation of Node Metastasis. Journal of Comparative Pathology 151:329–
593 338. https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2014.07.004

594 Worley DR (2014) Incorporation of sentinel lymph node mapping in dogs with mast cell
595 tumours: 20 consecutive procedures. Vet Comparative Oncology 12:215–226.
596 https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2012.00354.x

597 Zanardi S, Guerra D, Sabattini S, et al (2025) Intraoperative methylene blue staining is
598 effective as a single mapping technique in the identification of sentinel lymph nodes in dogs
599 with low-grade mast cell tumours. J of Small Animal Practice jsap.13832.
600 https://doi.org/10.1111/jsap.13832

601

602

603

604

605

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo prospectivo envolvendo 21 cães (26 tumores), a abordagem do linfonodo sentinela (SLN) mostrou-se essencial para o estadiamento nodal do mastocitoma cutâneo canino (cMCT). O azul de metileno 2% apresentou maior taxa de detecção de SLNs do que a linfografia indireta com Lipiodol, e embora as técnicas tenham apresentado concordância substancial, ela não foi completa, indicando que métodos distintos podem revelar áreas de drenagem complementares. A combinação das estratégias permitiu identificar SLNs adicionais em alguns tumores, evidenciando que avaliar apenas o linfonodo regional anatômico pode levar a subestadiamento.

A prevalência de metástase nos SLNs (HN2–HN3) foi elevada, e o status linfonodal revelou-se o fator mais consistente para orientar recomendações de tratamento adjuvante, superando a importância isolada das margens cirúrgicas. Observou-se ainda associação significativa entre tamanho tumoral e acometimento nodal, reforçando a indicação de biópsia do SLN mesmo em lesões pequenas quando presentes outros fatores de risco. A morbidade relacionada aos procedimentos foi baixa e manejável, confirmando a viabilidade clínica do protocolo.

Em resumo, os achados reforçam a necessidade de mapeamento linfático individualizado no cMCT, indicam o azul de metileno como traçador intraoperatório preferencial, sugerem que a combinação Lipiodol + azul pode revelar drenagens alternativas e SLNs adicionais, e demonstram que a biópsia do SLN aprimora o estadiamento e fornece informações terapêuticas mais precisas do que a avaliação limitada ao linfonodo regional.

7. Referências Bibliográficas

ANNONI, M.; BORGONOVO, S.; ARALLA, M. Sentinel lymph node mapping in canine mast cell tumours using a preoperative radiographic indirect lymphography: Technique description and results in 138 cases. **Veterinary and Comparative Oncology**, [*s. l.*], v. 21, n. 3, p. 469–481, 2023.

BAGINSKI, H.; DAVIS, G.; BASTIAN, R. P. The Prognostic Value of Lymph Node Metastasis with Grade 2 MCTs in Dogs: 55 Cases (2001–2010). **Journal of the American Animal Hospital Association**, [*s. l.*], v. 50, n. 2, p. 89–95, 2014.

BEER, P. *et al.* The role of sentinel lymph node mapping in small animal veterinary medicine: A comparison with current approaches in human medicine. **Veterinary and Comparative Oncology**, [*s. l.*], v. 16, n. 2, p. 178–187, 2018a.

BEER, P. *et al.* The role of sentinel lymph node mapping in small animal veterinary medicine: A comparison with current approaches in human medicine. **Veterinary and Comparative Oncology**, [*s. l.*], v. 16, n. 2, p. 178–187, 2018b.

BLACKWOOD, L. *et al.* European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. **Veterinary and Comparative Oncology**, [*s. l.*], v. 10, n. 3, 2012a. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1476-5829.2012.00341.x. Acesso em: 6 abr. 2025.

BLACKWOOD, L. *et al.* European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. **Veterinary and Comparative Oncology**, [*s. l.*], v. 10, n. 3, 2012b. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1476-5829.2012.00341.x. Acesso em: 6 mar. 2025.

BRISSOT, H. N.; EDERY, E. G. Use of indirect lymphography to identify sentinel lymph node in dogs: a pilot study in 30 tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, [*s. l.*], v. 15, n. 3, p. 740–753, 2017.

BROWDER, T. *et al.* Antiangiogenic Scheduling of Chemotherapy Improves Efficacy against Experimental Drug-resistant Cancer. [*s. l.*], 2000.

CHALFON, C. *et al.* Lymphadenectomy improves outcome in dogs with resected Kiupel high-grade cutaneous mast cell tumours and overtly metastatic regional lymph nodes. **Journal of Small Animal Practice**, [*s. l.*], v. 63, n. 9, p. 661–669, 2022.

CHITI, L. E. *et al.* Surgical complications following sentinel lymph node biopsy guided by γ-probe and methylene blue in 113 tumour-bearing dogs. **Veterinary and Comparative Oncology**, [*s. l.*], v. 21, n. 1, p. 62–72, 2023a.

CHITI, L. E. *et al.* Surgical complications following sentinel lymph node biopsy guided by γ-probe and methylene blue in 113 tumour-bearing dogs. **Veterinary and Comparative Oncology**, [*s. l.*], v. 21, n. 1, p. 62–72, 2023b.

COLLIVIGNARELLI, F. *et al.* Lymphatic Drainage Mapping with Indirect Lymphography for Canine Mammary Tumors. **Animals**, [*s. l.*], v. 11, n. 4, p. 1115, 2021.

DE NARDI, A. B. *et al.* Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Cutaneous and Subcutaneous Mast Cell Tumors. **Cells**, [*s. l.*], v. 11, n. 4, p. 618, 2022.

ESCODA LLORENS, X. *et al.* Comparative Evaluation of Cytological and Histopathological Diagnostic Performance in Detecting Nodal Metastasis of Canine Mast Cell Tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, [*s. l.*], p. vco.70008, 2025.

FERRARI, R. *et al.* The impact of extirpation of non-palpable/normal-sized regional lymph nodes on staging of canine cutaneous mast cell tumours: A multicentric retrospective study. **Veterinary and Comparative Oncology**, [*s. l.*], v. 16, n. 4, p. 505–510, 2018.

HAY, J. K.; LARSON, V. S. Lomustine (CCNU) and prednisone chemotherapy for high-grade completely excised canine mast cell tumors. [*s. l.*], v. 60, p. 1326–1330, 2019.

HORTA, R. S. *et al.* Assessment of Canine Mast Cell Tumor Mortality Risk Based on Clinical, Histologic, Immunohistochemical, and Molecular Features. **Veterinary Pathology**, [*s. l.*], v. 55, n. 2, p. 212–223, 2018.

KAMSTOCK, D. A. *et al.* Recommended Guidelines for Submission, Trimming, Margin Evaluation, and Reporting of Tumor Biopsy Specimens in Veterinary Surgical Pathology. **Veterinary Pathology**, [*s. l.*], v. 48, n. 1, p. 19–31, 2011.

KU, C. -K.; KASS, P. H.; CHRISTOPHER, M. M. Cytologic–histologic concordance in the diagnosis of neoplasia in canine and feline lymph nodes: a retrospective study of 367 cases. **Veterinary and Comparative Oncology**, [*s. l.*], v. 15, n. 4, p. 1206–1217, 2017.

LANGENBACH, A. *et al.* Sensitivity and specificity of methods of assessing the regional lymph nodes for evidence of metastasis in dogs and cats with solid tumors. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, [*s. l.*], v. 218, n. 9, p. 1424–1428, 2001.

LONDON, C. A.; SEGUIN, B. Mast cell tumors in the dog. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, [*s. l.*], v. 33, n. 3, p. 473–489, 2003.

MATTIOLI, G. *et al.* Peripheral sentinel lymphadenectomy in 163 dogs: Postoperative surgical complications and comparison between intraoperative dissection techniques. **Veterinary Surgery**, [*s. l.*], v. 54, n. 4, p. 766–776, 2025.

RASSNICK, K. M. *et al.* Treatment of Canine Mast Cell Tumors with CCNU (Lomustine). [*s. l.*], v. 13, p. 601–605, 1999.

RINALDI, V. *et al.* The Role of Fine Needle Aspiration of Liver and Spleen in the Staging of Low-Grade Canine Cutaneous Mast Cell Tumor. **Veterinary Sciences**, [*s. l.*], v. 9, n. 9, p. 473, 2022.

SABATTINI, S. *et al.* **A retrospective study on prophylactic regional lymphadenectomy versus nodal observation only in the management of dogs with stage I, completely resected, low-grade cutaneous mast cell tumors**. [*S. l.*]: In Review, 2021. Disponível em: https://www.researchsquare.com/article/rs-156548/v1. Acesso em: 28 fev. 2025.

SCHABEL, F. M. Rationale for adjuvant chemotherapy. **Cancer**, [*s. l.*], v. 39, n. 6, p. 2875–2882, 1977.

SOUSSA, R. W. *et al.* Vinblastine/prednisolone chemotherapy leads to hematological toxicity in dogs with high-grade or metastatic mast cell tumors. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, [*s. l.*], v. 262, n. 12, p. 1644–1649, 2024.

STEFANELLO, D. *et al.* Weishaar's classification system for nodal metastasis in sentinel lymph nodes: Clinical outcome in 94 dogs with mast cell tumor. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, [*s. l.*], v. 38, n. 3, p. 1675–1685, 2024.

STIBOROVA, K. *et al.* Haematologic toxicity in dogs with mast cell tumours treated with vinblastine/prednisolone chemotherapy with/without radiotherapy. **Journal of Small Animal Practice**, [*s. l.*], v. 60, n. 9, p. 534–542, 2019.

STREFEZZI, R. D. F. *et al.* Avaliação da proliferação celular como indicador prognóstico para mastocitomas cutâneos caninos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [*s. l.*], v. 30, n. 7, p. 559–565, 2010.

STREFEZZI, R. F. *et al.* Prognostic indicators for mast cell tumors. **Prognostic indicator for mast cell tumors**, [*s. l.*], v. 2, n. 2, p. 110–121, 2009.

SUAMI, H. *et al.* Lymphatic Territories (Lymphosomes) in a Canine: An Animal Model for Investigation of Postoperative Lymphatic Alterations. **PLoS ONE**, [*s. l.*], v. 8, n. 7, p. e69222, 2013.

SUAMI, H. Lymphosome concept: Anatomical study of the lymphatic system. **Journal of Surgical Oncology**, [*s. l.*], v. 115, n. 1, p. 13–17, 2017.

THAMM, D. H. *et al.* Prognostic and predictive significance of KIT protein expression and *c-kit* gene mutation in canine cutaneous mast cell tumours: A consensus of the Oncology-Pathology Working Group. **Veterinary and Comparative Oncology**, [*s. l.*], v. 17, n. 4, p. 451–455, 2019.

THAMM, D. H.; MAULDIN, E. A.; VAIL, D. M. Prednisone and Vinblastine Chemotherapy for Canine Mast Cell Tumor—41 Cases (1992–1997). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, [*s. l.*], v. 13, n. 5, p. 491–497, 1999.

WEBSTER, J. D. *et al.* Cellular Proliferation in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Associations with *c-KIT* and Its Role in Prognostication. **Veterinary Pathology**, [*s. l.*], v. 44, n. 3, p. 298–308, 2007.

WEISHAAR, K. M. *et al.* Correlation of Nodal Mast Cells with Clinical Outcome in Dogs with Mast Cell Tumour and a Proposed Classification System for the Evaluation of Node Metastasis. **Journal of Comparative Pathology**, [*s. l.*], v. 151, n. 4, p. 329–338, 2014.

WILLMANN, M. *et al.* Proposed Diagnostic Criteria and Classification of Canine Mast Cell Neoplasms: A Consensus Proposal. **Frontiers in Veterinary Science**, [*s. l.*], v. 8, p. 755258, 2021.

ZANARDI, S. *et al.* Intraoperative methylene blue staining is effective as a single mapping technique in the identification of sentinel lymph nodes in dogs with low-grade mast cell tumours. **Journal of Small Animal Practice**, [*s. l.*], p. jsap.13832, 2025.

WELLE, M. M. *et al*. Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. **Veterinary Dermatology**, [*s. l.*], v. 19, n. 6, p. 321–339, 2008.

WISNER, E. R.; SEIBERT, J. A.; KATZBERG, R. W. QUANTITATIVE METHODS FOR INDIRECT CT LYMPHOGRAPHY. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, [*s. l.*], v. 39, n. 2, p. 110–116, 1998.

WORLEY, D. R. Incorporation of sentinel lymph node mapping in dogs with mast cell tumours: 20 consecutive procedures. **Veterinary and Comparative Oncology**, [*s. l.*], v. 12, n. 3, p. 215–226, 2014.

APÊNDICE A

FICHA MASTOCITOMA CANINO

PACIENTE NÚMERO: DATA:
FICHA: RAÇA:
SEXO: PESO:
IDADE:

LINFONODOS

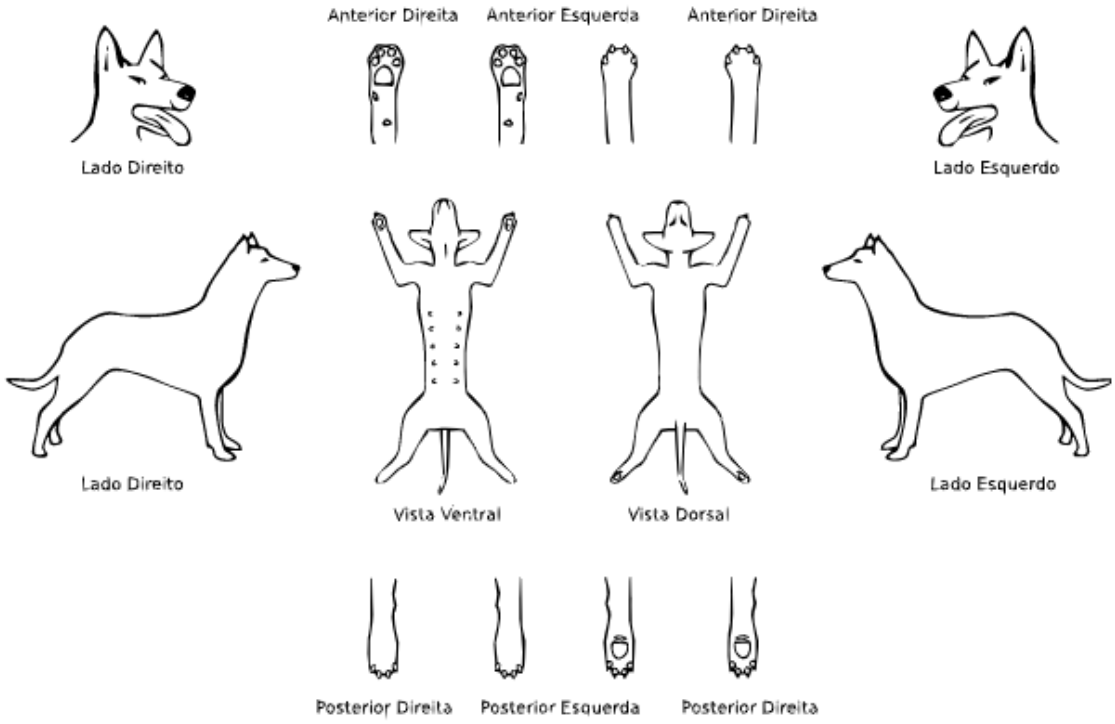
Lado direito:

Mandibular :___ Escapular: ___Axilar:___ Inguinal:___ Poplíteo:___.

Lado esquerdo:

Mandibular :___ Escapular: ___Axilar:___ Inguinal:___ Poplíteo:___.

NÓDULOS CUTÂNEOS- Localização e medidas (3 dimensões).



<u>Tamanho</u>

Nódulo 1.

Nódulo 2.

Nódulo 3.

Tempo de evolução:_____. Crescimento: ☐ lento rápido ☐ estável ☐

Consistência: ☐ Macia ☐ Firme ☐ Flutuante

Superfície: ☐ Lisa ☐ Irregular

Aderido à planos profundos: ☐ sim ☐ não

Alopecia: ☐ sim ☐ não

Ulceração : ☐ sim ☐ não

Eritema: ☐ sim ☐ não

Inserção: ☐ pedunculado ☐ séssil

Nódulo 2:

Tamanho :

Tempo de evolução:_____. Crescimento: ☐ Lento Rápido ☐ Estável ☐

Consistência: ☐ Macia ☐ Firme ☐ Flutuante

Superfície: ☐ Lisa ☐ Irregular

Aderido à planos profundos: ☐ sim ☐ não

Alopecia: ☐ sim ☐ não

Ulcerado: ☐ sim ☐ não

Eritema: ☐ sim ☐ não

Inserção: ☐ Pedunculado ☐ Séssil

Nódulo 3:

Tamanho (3 dimensões):

Tempo de evolução:_____. Crescimento: ☐ lento rápido ☐ estável ☐

Consistência: ☐ Macia ☐ Firme ☐ Flutuante

Superfície: ☐ Lisa ☐ Irregular

Aderido à planos profundos: ☐ sim ☐ não

Alopecia: ☐ sim ☐ não

Ulcerado: ☐ sim ☐ não

Eritema: ☐ sim ☐ não

Inserção: ☐ pedunculado ☐ séssil

ESTADIAMENTO:

Resultado citológico:

Resultado histopatológico:

TRATAMENTO:

☐ **CIRURGIA** ☐ **CIRURGIA + QUIMIOTERAPIA ADJUVANTE**

☐ **CIRURGIA+ELETROQUIMIOTERAPIA**

Protocolo de quimioterapia:_____

_____

_____.

Obs:

ANEXO B

Avaliação linfonodo

PACIENTE NÚMERO: DATA:
FICHA: RAÇA:
SEXO: PESO:
IDADE:

AVALIAÇÃO DE METÁSTASE NO LINFONODO

☐	HN0 (linfonodo não metastático)	Caracterizado pela ausência ou mastócitos raros (0-3), isolado nos seios (paracortical, subcapsular ou medular), e/ou parênquima do linfonodo por campo de 40X.
☐	HN1 (linfonodo pré-metastático)	Caracterizado por mais de três mastócitos isolados nos seios (subcapsular, paracortical, ou medular), e/ou parênquima do linfonodo por campo de 40X , em pelo menos quatro campos.
☐	HN2 (metástase precoce ou inicial)	Caracterizado por agregados(clusters) de mastócitos (mais de três células) nos seios (paracortical, subcapsular ou medular) e/ou parênquima, ou cordões sinusoidais de mastócitos.
☐	HN3 (metástase óbvia ou avançada)	Caracterizado pela alteração da arquitetura do linfonodo, com focos de mastócitos organizados em um cordão ou manto.

LOCALIZAÇÃO DO LINFONODO SENTINELA

(Nome do linfonodo (s) sentinela localizado)

Linfonodo(s) sentinela detectado através do lipiodol	**Linfonodo(s) sentinela detectado através do azul de metileno**