

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VETERINÁRIA



DISSERTAÇÃO

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DE DOIS SISTEMAS DE CLASSIFICAÇÃO
HISTOLÓGICA E DA VALIDADE DA QUANTIFICAÇÃO DA AgNOR PARA
ADENOMAS E CARCINOMAS MAMÁRIOS CANINOS**

TATIANE CAMACHO MENDES

Pelotas, 2006

TATIANE CAMACHO MENDES

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DE DOIS SISTEMAS DE CLASSIFICAÇÃO
HISTOLÓGICA E DA VALIDADE DA QUANTIFICAÇÃO DA AgNOR PARA
ADENOMAS E CARCINOMAS MAMÁRIOS CANINOS**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Veterinária da
Universidade Federal de Pelotas,
como requisito parcial à obtenção do
título de Mestre em Ciências (área de
conhecimento: Patologia Animal).

Orientadora: Cristina Gevehr Fernandes

Co-orientadora: Josiane Bonel-Raposo

Pelotas, 2006

M538a Mendes, Tatiane Camacho

Avaliação comparativa de dois sistemas de classificação histológica e da validade da quantificação da AgNOR para adenomas e carcinomas mamários caninos / Tatiane Camacho Mendes ; orientador Cristina Gevehr Fernandes; co-orientador Josiane Bonel-Raposo. – Pelotas, 2006.–65f. Dissertação (Mestrado).Patologia Animal. Faculdade de Veterinária. Universidade Federal de Pelotas,. Pelotas, 2006.

1.Canino 2. Neoplasma mamário 3. Morfológico-descriptivo 4. AgNOR I . Fernandes, Cristina Gevehr (orientador)
II .Título.

CDD 636.089607

Banca examinadora:

Profª Drª Dominguita Lühers Graça

Profª Drª Eliza Simone Viegas Sallis

Profª Drª Márcia de Oliveira Nobre

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Cláudio e Tânia, ao meu irmão, Claudir, e ao meu grande amigo Roger, pela paciência, carinho e dedicação. E principalmente por acreditarem na importância desta conquista.

Agradecimentos

A Deus que me protegeu e acolheu nos momentos mais difíceis desta caminhada.

A Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de realizar o curso de pós-graduação, e a CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

A professora Cristina Gevehr Fernandes, que aceitou o desafio de me orientar. Ressalto aqui sua dedicação, carinho e bom humor, característicos de sua personalidade, e indispensáveis para a conclusão deste trabalho. Ela é uma pessoa maravilhosa e especial em todos os aspectos. Ela é “a minha orientadora mega show, poderosa e necessária”. Cris, muito obrigado.

A professora Josiane Bonel-Raposo, minha co-orientadora, pelo carinho, dedicação, sensibilidade, paciência e apoio na realização deste trabalho.

Ao professor Luiz Paiva Carapeto, meu eterno “Patrão”. Uma pessoa que não pode ser definida com palavras, somente com sentimentos, pois é toda coração. Que para mim se tornou um verdadeiro pai (para não dizer mãe) dentro da universidade. Foi o responsável por eu ter trilhado este caminho acadêmico e concluído este trabalho. Uma pessoa que me orgulho de chamar de amigo. A ele o meu eterno muito obrigado.

Aos professores do Departamento de Patologia Animal, Margarida, Simone e Mielke, pela dedicação profissional, apoio e prontidão para me auxiliar em qualquer dificuldade.

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Patologia Animal, especialmente aos meus queridos João, Zuleika, Ana Lúcia, Mauro, Nico, Rosária, Barbachã, Marcel, Daiana e demais funcionários que participaram na evolução deste projeto.

Aos grandes amigos e colegas do mestrado, Thomas, Patrícia e Milton, os quais proporcionaram bons momentos de convivência nesta importante etapa. E principalmente a minha grande amiga e colega Márcia, uma pessoa ser par, que sempre esteve presente no meu dia-a-dia e disposta a me ajuda em tudo. Esta é uma pessoa cativante e especial, que tive a sorte e a honra de conhecer. Um ombro amigo nas horas mais difíceis e mais alegres, em outras palavras “ela é tudo de bom”.

A todos os professores, colegas e funcionários do curso de pós-graduação.

Aos estagiários e bolsistas do Departamento de Patologia Animal, Amanda, Beatriz, Camila, Camila Farias, Conrado, Fábio, Fernanda, Guisepe, Juliana, Letícia, Mariana, Monique, Vanessa, sempre pacientes, alegres, dispostos e compreensivos, o meu muito obrigado.

Em especial aos animais, que em sua humildade nos confiam a vida e seu destino, muitas vezes, em benefício do estudo e da pesquisa.

"Você tem experiência?"

Já fiz cosquinha no meu irmão só pra ela parar de chorar, já me queimei brincando com vela. Eu já fiz bola de chiclete e melequei todo o rosto, já conversei com o espelho, e até já brinquei de ser bruxo.

Já quis ser aeromoça, bailarina, advogada, piloto da aeronautica e trapezista. Já me escondi atrás da cortina e esqueci os pés pra fora. Já passei trote por telefone. Já tomei banho de chuva e acabei me viciando.

Já roubei beijo. Já confundi sentimentos. Peguei atalho errado e continuo andando pelo desconhecido. Já raspei o fundo da panela de arroz carreteiro, já chorei ouvindo música no ônibus.

Já tentei esquecer algumas pessoas, mas descobri que essas são as mais difíceis de se esquecer. Já subi escondido no telhado pra tentar pegar estrelas, já subi em árvore pra roubar fruta, já caí da escada de bunda.

Já fiz juras eternas, já escrevi no muro da escola, já chorei sentado no chão do banheiro, fugi de casa pra sempre, e voltei no outro instante. Já corri pra não deixar alguém chorando, já fiquei sozinho no meio de mil pessoas sentindo falta de uma só.

Já vi pôr-do-sol cor-de-rosa e alaranjado, já me joguei na piscina sem vontade de voltar, já bebi caipirinha até sentir dormentes os meus lábios e os dedos das mãos, já olhei a cidade de cima e mesmo assim não encontrei meu lugar.

Já senti medo do escuro, já tremi de nervoso, já quase morri de amor, mas renasci novamente pra ver o sorriso de alguém especial. Já acordei no meio da noite e fiquei com medo de levantar.

Já apostei em correr descalço na rua, já gritei de felicidade, já roubei rosas num enorme jardim. Já me apaixonei e achei que era para sempre, mas sempre era um "para sempre" pela metade.

Já deitei na grama de madrugada e vi a Lua virar Sol, já chorei por ver amigos partindo, mas descobri que logo chegam novos, e a vida é mesmo um ir e vir sem razão.

Foram tantas coisas feitas, momentos fotografados pelas lentes da emoção, guardados num baú chamado coração. E agora um formulário me interroga, me encosta na parede e grita: "Qual sua experiência?".

Essa pergunta ecoa no meu cérebro: experiência... experiência. Será que ser "plantador de sorrisos" é uma boa experiência? Não! Talvez eles não saibam ainda colher sonhos! Agora gostaria de indagar uma pequena coisa para quem formulou esta pergunta:

"Experiência? Quem a tem, se a todo momento tudo se renova?"

(Autor desconhecido)

Resumo

MENDES, Tatiane Camacho **Avaliação comparativa de dois sistemas de classificação histológica e da validade da quantificação da AgNOR para adenomas e carcinomas mamários caninos**. 2006. 65f.. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O presente estudo teve como meta comparar dois métodos de classificação histológica tradicionais, morfologia-descritiva revisada por Misdorp (2002) e corroborada pela OSM/AFIP e graduação histológica aperfeiçoada por Elston & Ellis (1991). Isto foi aplicado em 87 carcinomas mamários caninos, para evidenciar se ambos se equivalem, se contrapõem ou se complementam, na determinação do potencial maligno dos tumores. Objetivou-se ainda verificar a existência da relação destes dois métodos com os índices de AgNOR/núcleo em 45 deste carcinomas e em 4 adenomas mamários caninos. Todos os carcinomas complexos localizaram-se nos graus I e II. Já os carcinomas simples distribuíram-se nos três graus. A análise de seus subtipos revelou que, os tubulopapilares distribuíram-se pelos três graus e os sólidos apenas nos graus II e III. Já a maioria dos anaplásicos eram grau III. Ao aplicar a técnica de AgNOR obteve-se uma média de 2,23 AgNORs/núcleo (amplitude 1,39 - 3,2). Quando os 49 tumores foram avaliados utilizando morfologia-descritiva, evidenciou-se que os valores médios de AgNOR eram menores em adenomas e carcinomas complexos do que em carcinomas simples. Já o subtipo tubulopapilar apresentou valores médios inferiores aos subtipos sólido e anaplásico. Ao analisar os 45 carcinomas, considerando o sistema de graduação histológica, percebeu-se que os tumores classificados como grau I apresentavam média inferior, aos classificados como grau II e grau III. Conclui-se que os dois sistemas de classificação se complementam, mas a graduação histológica fornece uma informação mais detalhada sobre o possível comportamento biológico destas neoplasias, e que a média de AgNORs/núcleo tende a elevar-se em tumores que apresentem características histológicas de malignidade.

PALAVRAS-CHAVE: neoplasmas mamários, morfologia-descritiva, graduação. AgNOR, comportamento biológico, caninos.

Abstract

MENDES, Tatiane Camacho. **Comparative evaluation of two histological classification systems and validity of AgNOR to adenomas and mammary canine carcinomas.** 2006. 65f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

This report compares 2 histological classification methods. One descriptive and a graduation system. They were used to classify 87 for mammary adenomas and carcinomas and test if they have equivalence, contraposition or complementarily in order to determine the malignant rate risk of these tumors. The relationship between these systems and the AgNOR index was also studied in 49 tumors. All complex carcinomas were grade I or II. Simplex carcinomas were all grade 3. Subtypes analysis revealed 3 grades of tubulopapilar carcinomas. Solid carcinomas were found only with in II and III grades. Anaplastic tumors were preferentially grade III. It was found an average of 2,23 AgNORs/nuclei (amplitude 1,39 - 3,2). In comparison with descriptive morphology, it as inferred that adenomas presents smaller vales as complex carcinomas and simple carcinomas. The tubulopapilar subtype presents average values smaller than solid and anaplastic subtypes. Tumors classified as grade I present AgNOR average lower than that of grades II and III. It was possible to conclude that the histological graduation system offers more information about the biological behavior. The AgNOR rate tends to elevate in tumors that present histological properties of malignity.

KEY-WORDS: mammary neoplasm. canine. morphological descriptive. graduation. AgNOR. biological behavior.

Lista de Figuras

Capítulo 1

- Figura 1 – Resumo do método semi-quantitativo para avaliação do grau histológico em carcinomas mamários, proposto por Elston & Ellis (1991).....25
- Figura 2 – Morfologia descritiva dos carcinomas mamários caninos: (A) carcinoma complexo, (B) carcinoma simples tubulopapilar, (C) carcinoma simples sólido, (D) carcinoma simples anaplásico.....28
- Figura 3 – Graduação histológica segundo o método de Elston & Ellis (1991) dos carcinomas mamários caninos: (A) carcinoma grau I, (B) carcinoma grau II, (C) carcinoma grau III29
- Figura 4 – Morfológico descritivo e graduação histológica dos carcinomas mamários: (A) carcinoma complexo grau II, (B) carcinoma simples tubulopapilar grau I, (C) carcinoma simples tubulopapilar grau II, (D) carcinoma simples tubulopapilar grau III, (E) carcinoma simples sólido grau III, (F) carcinoma simples anaplásico grau III.....30
- Figura 5 – Representação gráfica da distribuição dos diferentes tipos de carcinomas mamários caninos e seus respectivos graus de malignidade.....31

Capítulo 2

- Figura 1 – Resumo do método semi-quantitativo para avaliação do grau histológico em carcinomas mamários como proposto por Elston & Ellis (1991) .43
- Figura 2 – Distribuição das médias de AgNOR/núcleo dos tumores mamários caninos.....44

Lista de Tabelas e Quadros

Capítulo 1

Tabela 1 – Graduação de 87 carcinomas mamários caninos pelo método de Elston & Ellis (1991).....	26
Tabela 2 – Resumo comparativo da distribuição dos carcinomas mamários caninos, de acordo com parâmetros histológicos descritivos e graduação pelos critérios de Elston & Ellis (1991).....	27

Capítulo 2

Tabela 1 – Contagem de AgNORs/núcleo dos 49 tumores, de acordo com sua classificação morfológica descritiva	45
Tabela 2 – Contagem de AgNORs/núcleo dos 49 tumores, de acordo com sua classificação morfológica descritiva e respectivos subtipos histológicos	46
Tabela 3 – Contagem de AgNORs/núcleo dos 45 carcinomas, de acordo com sua graduação histológica	47

Lista de Abreviaturas e Siglas

AFIP: Instituto de Patologia das Forças Armadas Americanas

AgNOR: Regiões Organizadoras Nucleolares Argirofílicas

LRD: Laboratório Regional de Diagnóstico

OSM: Organização Mundial da Saúde

UFPEL: Universidade Federal de Pelotas

Sumário

Dedicatória	5
Agradecimentos	6
Resumo	9
Abstract	10
Lista de Figuras	11
Lista de Tabelas e Quadros	12
Lista de Abreviaturas e Siglas	13
Sumário	14
1. Introdução Geral.....	14
2. Revisão de Literatura	17
3. Capítulo 1: Avaliação comparativa dos sistemas de classificação de tumores mamários em cadelas por histomorfologia ou por graduação histológica.....	22
3.1. Resumo	22
3.2. Introdução.....	23
3.2. Materiais e Métodos	24
3.2.1. Amostras	24
3.2.2. Morfologia descritiva.....	24
3.2.3. Graduação histológica	24
3.3. Resultados.....	25
3.3.1. Estudo histológico-descritivo	25
3.3.2. Graduação dos tumores	25
3.3.3. Descritivo morfológico x Graduação	26
3.4. Discussão	26
3.5. Conclusões	36

3.6. Referências.....	36
4. Capítulo 2: Avaliação do uso da AgNOR como ferramenta prognóstica para tumores mamários caninos	39
4.1. Resumo	39
4.2. Introdução.....	40
4.3. Materiais e métodos	41
4.3.1. Amostras	41
4.3.2. Avaliação histológica	42
4.3.3. Análise estatística.....	43
4.4. Resultados.....	45
4.4.1. Método de AgNOR	45
4.4.2. Histológico descritivo e graduação dos tumores	45
4.4.3. Método de AgNOR x histológico-descritivo	45
4.4.4. Método de AgNOR x graduação histológica.....	47
4.4.5. Análise estatística.....	47
4.5. Discussão	47
4.6. Conclusões.....	52
4.7. Referências.....	52
5. Conclusões.....	56
6. Referências	57
Apêndice	63

1. Introdução Geral

A prevalência de câncer em cães vem aumentando consideravelmente. A crescente incidência das afecções neoplásicas nessa espécie possui várias razões. Entre elas está a maior longevidade observada nestes animais (De Nardi et al., 2002). Os tumores mamários são os neoplasmas mais comuns em caninos, logo após os tumores de pele (Moulton, 1990; De Nardi et al., 2002; Queiroga & Lopes, 2002; Misdorp, 2002). Nas fêmeas são os mais frequentes e encontram-se descritos em todo o mundo (Queiroga & Lopes, 2002).

Muitos esforços estão sendo direcionados para a adoção de critérios que permitam a padronização do diagnóstico, o entendimento do comportamento e evolução tumoral e a avaliação de fatores prognósticos como: morfologia, expressão de oncogenes e alterações gênicas. O conhecimento e adoção desses parâmetros, na rotina diagnóstica, são de fundamental importância para a escolha e sucesso de terapias que comprovam diminuição da recorrência tumoral e aumento da sobrevivência (Hellmén et al., 1993).

A biologia dos tumores mamários caninos interessa à comunidade científica em geral, pelo fato destes tumores apresentarem similaridades epidemiológicas (Hellmén et al., 1993), clínicas (Mulas et al., 2005) e biológicas (Moulton, 1990) com os neoplasmas mamários da mulher sendo por isso, considerados ótimos modelos em estudos comparativos (Queiroga & Lopes, 2002).

Em medicina veterinária é cada vez mais importante estabelecer o prognóstico de um animal com doença oncológica. Desta forma podem-se iniciar novas modalidades terapêuticas, se aconselhadas, ou não proceder a qualquer tratamento, evitando assim custos desnecessários (Queiroga & Lopes, 2002).

Uma grande quantidade de trabalhos tem proposto numerosos fatores prognóstico putativos do câncer de mama primário com diferentes níveis de significância. Atualmente, técnicas de avaliação histológicas que envolvem alta tecnologia têm sido desenvolvidas com o objetivo de melhorar o prognóstico dos tumores mamários. Como conseqüência há uma diminuição no interesse, por parte dos pesquisadores, na avaliação histopatológica tradicional das amostras de câncer de mama, a qual pode gerar uma grande quantidade de informação sobre a biologia tumoral, o que é útil clinicamente (Pinder et al., 1995).

A classificação histológica dos tumores mamários, usada em medicina veterinária, não é consensual. Atualmente são utilizados diferentes sistemas, para classificar histologicamente as lesões mamárias caninas, de forma a prever o seu comportamento biológico (Queiroga & Lopes, 2002). Dentre as mais usadas, a classificação revisada por Misdorp (2002) e corroborada pela Organização Mundial da Saúde/Instituto de Patologia das Forças Armadas Americanas (OMS/AFIP), é a mais utilizada por sua facilidade de aplicação.

Desde a década passada, a graduação histológica vem se tornando amplamente aceita como um poderoso indicador de prognóstico em câncer mamário. Um dos sistemas de graduação tumoral comumente utilizado, para o câncer mamário humano, foi aperfeiçoado por Elston & Ellis (1991). Este sistema combina pleomorfismo nuclear, formação tubular e taxa mitótica, sendo os tumores mamários classificados em graus de malignidade histológica visando o prognóstico.

Várias tentativas têm sido realizadas para melhorar a exatidão do prognóstico de tumores, e para minimizar a subjetividade das classificações histológicas estabelecidas (Piffko et al., 1997a). Há, portanto, uma grande necessidade de se estudar novos marcadores de prognóstico que possam orientar o clínico na escolha da modalidade terapêutica a ser empregada. Além disso, esses marcadores são fundamentais para o melhor entendimento da biologia desses neoplasmas (Bryne, 1998).

Existe uma ampla variedade de métodos que foram descobertos por esta área de pesquisa, mas somente poucos são também aplicáveis em tecidos inclusos em parafina, como é o caso da técnica de AgNOR (Munakata & Hendricks, 1994; Löhr et al., 1997). Esta foi introduzida dentro da patologia tumoral por Ploton et al. (1986), os quais notaram que as AgNORs eram mais abundantes em células neoplásicas malignas do que em benignas (Derenzini, 2000; Sfacteria et al., 2003). Inicialmente

esta técnica foi usada como um parâmetro para o diagnóstico de malignidade, sendo aplicada na análise do prognóstico da doença neoplásica (Derenzini, 2000). A atividade proliferativa celular é representada pelo aumento de Regiões Organizadoras Nucleolares por núcleo (NORs/núcleo), o que reflete seu estágio de mitose (Crocker, 1996; Mello & Alves, 1999; Derenzini, 2000).

O presente estudo teve como meta aplicar dois métodos de classificação histológica tradicionais, para tumores mamários caninos, comparando-os, com o objetivo de evidenciar se ambos se equivalem, se contrapõem ou se completam, na comprovação do potencial maligno dos tumores. Posteriormente, verifica-se a existência da correlação destes dois métodos com os índices de AgNOR por núcleo, objetivando também, a definição de parâmetros de prognóstico.

2. Revisão de Literatura

As características clínicas e histopatológicas dos tumores mamários caninos são extremamente variáveis (Pérez Alenza et al., 1997), podendo ocorrer como nódulos solitários ou múltiplos. Tanto tumores benignos quanto malignos podem evidenciar-se como nódulos pequenos, firmes, e bem demarcados, de modo que se torna impossível à diferenciação dos dois tipos apenas pelo exame físico (O'keefe, 1997).

Para os clínicos, é importante prever a evolução da doença tumoral mamária canina. Atualmente, novos fatores prognósticos têm sido estudados, no entanto, uma importante parte desta informação prognóstica tem sido baseada em dados clínicos e histopatológicos (Pérez Alenza et al., 1997), no qual o prognóstico é freqüentemente expressado como a porcentagem de animais que sobrevivem de 1 a 2 anos após a mastectomia inicial. Em cães, a sobrevivência de 2 anos alcança de 25 a 40% dos casos, e este tempo é influenciado por fatores não relacionados ao tumor mamário (Misdorp, 2002).

A diversidade de tipos histológicos dos tumores de mama caninos tem produzido conceitos conflitantes relacionados à histogênese e classificação, o que resulta em uma variedade de sistemas taxonômicos (Martins et al., 2002). Atualmente existem muitas tentativas para otimizar sua classificação visando determinar seu comportamento biológico (Löhr et al., 1997; Benjamin et al., 1999), pelo fato destes tumores serem muito comuns em cães (Moulton, 1990; Simon et al., 2001; Misdorp, 2002; Okamura et al., 2004; Mulas et al., 2005).

Estes podem apresentar vários componentes histológicos, tais como, a abundante proliferação de células mioepiteliais e componentes mesenquimais como

cartilagem, osso, medula óssea ou vários (Monteiros et al., 2002, 2005; Akiyoshi et al., 2004).

Os métodos de classificação de tumores mamários caninos baseiam-se em 3 critérios: histogênese, histologia descritiva e prognóstico (Misdorp, 2002). As classificações mais utilizadas são fundamentadas principalmente na avaliação histopatológica (descrição morfológica tumoral), e somente uma pequena parte é baseada na histogênese. A classificação histogênica é dificultada pela falta de capacidade em determinar que tipo celular específico origina certos tipos de tumores mamários. Também, pelas idéias conflitantes quanto ao papel do mioepitélio na gênese de tumores complexos e mistos e, mais freqüentemente, nos neoplasmas benignos caninos (Gama et al., 2003).

Um destes métodos de classificação foi recentemente revisado por Misdorp (2002) e corroborado pela OMS/AFIP. Este, de uma certa forma, objetiva o prognóstico, baseando-se na descrição morfológica e histogênica. Os tumores malignos, por este método, são classificados em ordem crescente de malignidade, como: carcinoma não infiltrativo (*in situ*), carcinoma complexo (com envolvimento de dois tipos celulares: epitélio e mioepitélio), carcinoma simples (com envolvimento de um único tipo celular: epitélio; subtipos tubulopapilar, sólido, e anaplásico), carcinomas de tipos especiais (subtipos de células estreladas, com diferenciação escamosa, mucinoso e rico em lipídeos), sarcomas (subtipos fibrossarcoma, osteossarcoma, carcinosarcoma e outros sarcomas) e carcinoma ou sarcoma em tumor benigno. Já os tumores benignos são classificados em adenoma (subtipos simples, complexo e basalóide), fibroadenoma (subtipos baixa e alta celularidade), tumor benigno misto, papiloma ductal, tumores não classificados e displasias/hiperplasias mamárias (subtipos hiperplasia ductal, hiperplasia lobular, cistos, ectasia ductal, fibrose focal ou fibroesclerose e ginecomastia) (Misdorp, 2002).

Entre as variáveis prognósticas, o tipo tumoral tem sido apresentado como um fator importante em quase todos os estudos, havendo aumento de malignidade de carcinomas complexos para carcinomas simples e sarcomas (Monteiros et al., 2005).

Pode ocorrer diferença no prognóstico entre carcinomas mamários complexos e simples. Os tumores de padrão simples são descritos como lesões que tendem a ser localmente invasivas, e na maioria dos casos, infiltram os vasos linfáticos

(Misdorp & Hart, 1979; Misdorp, 2002). Devido a estas particularidades, achados similares foram encontrados em outros estudos prognósticos. Monlux et al. (1977), Yamagami et al. (1996b) e Misdorp (2002), afirmaram que, animais que possuíam carcinomas sem formação tubular ou proliferação de células mioepiteliais tinham uma taxa de sobrevida menor que animais que possuíam carcinomas com estas características. Esta diferença prognóstica, porém, não foi evidenciada em um trabalho que estudou uma população de cães Beagle expostos a radiação (Benjamin et al., 1999).

A malignidade de um neoplasma é avaliado por vários itens subdivididos, preenchendo e considerando determinados aspectos do prognóstico dos tumores mamários (Ferreira et al., 2003). Em pacientes humanos, o método mais comum para graduação histológica de carcinomas mamários é o método de Elston & Ellis (1991). A graduação por este método mostrou uma forte relação com o prognóstico em um grande número de pacientes com vários tipos de tumores acompanhados por um longo período (Pinder et al., 1995; Karayannopoulou et al., 2005). Recentemente ele também tem sido usado em estudos de tumores mamários caninos (Dutra et al., 2004; Karayannopoulou et al., 2005). O sistema é facilmente utilizado e com experiência pode ser aplicado rapidamente (Pinder et al., 1995).

A graduação histológica avaliada neste método é um forte indicador da sobrevida dos pacientes. Em medicina humana, pacientes com carcinomas de grau I tem uma chance de 85% de sobrevivência por um período de 10 anos, comparado com menos que 45% para pacientes com tumores de grau III (Pinder et al., 1995). Independentemente do método utilizado para a graduação tumoral, sempre há um elemento de subjetividade e, como consequência, há uma reduzida reprodutibilidade dos resultados. No entanto, a graduação histológica, pelo método proposto por Elston & Ellis (1991), foi relatada como um indicador prognóstico objetivo de malignidade, semelhante à avaliação da fração celular na fase S, por citometria de fluxo, ou do índice de proliferação celular pelo Ki-67, através da imunistoquímica. Sendo considerado um método seguro e amplamente utilizado em medicina humana (Karayannopoulou et al., 2005).

O interesse na complementação dos métodos tradicionais usados para avaliar o prognóstico do câncer tem levado ao desenvolvimento de diferentes tipos de marcadores tumorais (Schmitt, 1999; Oshima & Forones, 2001). Na prática veterinária estes ainda não são comumente utilizados, e existe a necessidade do

desenvolvimento de novas estratégias para o diagnóstico e prognóstico de tumores mamários caninos (Okamura et al., 2004).

A identificação destes marcadores, relacionados com recidiva, sobrevida e resposta terapêutica, facilitaria a compreensão do comportamento biológico tumoral e, conseqüentemente, a identificação de pacientes que correm maiores riscos por razão da doença. Um marcador prognóstico para neoplasmas pode ser definido como qualquer molécula capaz de, no momento do diagnóstico (ou cirurgia), fornecer informações a respeito da evolução clínica do tumor. Para tal, este deve estar relacionado a determinadas características biológicas envolvidas na transformação celular neoplásica, no crescimento tumoral ou no processo da cascata metastática (Schmitt, 1999). A padronização destes marcadores permitiria discriminar, com maior clareza, pacientes que possam ser favorecidos com cirurgia, cirurgia associada à quimioterapia, tratamentos mais agressivos ou protocolos experimentais (Oshima & Forones, 2001).

A proliferação celular é o processo biológico mais fundamental, em razão do seu papel no crescimento e na manutenção da homeostasia do tecido. Especialmente em tumores, a proliferação celular tem tradicionalmente recebido muita atenção, tornado-se popular em histopatologia como um meio de prever o comportamento dos tumores, ou seja, sua probabilidade de recorrência no local, seu potencial de metastizar e a capacidade de desenvolver esta metástase, e por meio deste indica o tempo livre sem a doença e o tempo de sobrevivência até a morte (van Diest et al., 1998).

Nos últimos anos, a técnica AgNOR vem se tornando um método amplamente utilizado na patologia tumoral, principalmente para a avaliação da agressividade de neoplasmas malignos e do prognóstico (Mello & Alves, 1999; Korneyev et al., 2000). Tal conceito indica que o uso das AgNORs tem um valor adicional, podendo ser associado aos demais métodos que avaliam a velocidade de crescimento, para, enfim, obter-se uma visão mais precisa da atividade proliferativa do tumor (Mello & Alves, 1999).

A técnica de AgNOR se baseia na ligação da prata coloidal às proteínas ácidas, não-histônicas, associadas as NORs (Tateishi et al., 1995; Rivero & Aguiar, 2002; Sfacteria et al., 2003), e são observadas como pontos intranucleares, aglomerados, castanhos-escuros, isolados e grandes ou pequenos e numerosos

(Crocker, 1996; Derenzini, 2000; Trerè, 2000; Oshima & Forones, 2001; Sfacteria et al., 2003; Dzimira, 2005).

Vários estudos sugerem que a associação da quantidade de AgNORs com o prognóstico do câncer, era consequência deste valor representar o tempo da velocidade da proliferação celular (Derenzini, 2000). Assim, um alto valor de AgNOR caracteriza tumores com alta atividade metabólica e rápida atividade proliferativa, sendo que uma alta quantidade de AgNOR pode ser considerada como um marcador de fenótipo maligno tumoral com pobre prognóstico (Pich et al., 2000).

Já foi constatado que, as proteínas AgNOR tendem a estar em maior número em células neoplásicas, indicando que uma maior velocidade de proliferação celular corresponderia a uma maior quantidade de proteínas AgNOR (Sfacteria et al., 2003). Em uma dupla coloração com AgNOR e Ki-67, realizada em tumores mamários humanos, foi observado que, o número de AgNORs variou de 1 a 3. Neste estudo os núcleos Ki-67 positivos possuíam de 2 a 12 AgNORs. Como a positividade ao Ki-67 reflete células que estão em ciclo, isto significou que as células que apresentavam poucas quantidades de AgNORs eram células em repouso, ao passo que células com números elevados de AgNORs representavam células em ciclo (Mourad et al., 1992).

Em outro estudo, que usou dupla marcação para o PCNA (antígeno de proliferação celular) e AgNOR, em carcinomas adenóides císticos humanos, foram encontrados valores médios de AgNORs/núcleo inferiores, para células negativas para o PCNA, e superiores para células positivas. O PCNA é uma proteína nuclear que possui importante papel na replicação do DNA. A imunomarcação para o PCNA tem sido muito utilizada na avaliação da proliferação celular de diversos tumores, mostrando-se útil na discriminação entre neoplasias benignas e malignas, e na correlação com o grau de malignidade (Rivero & Aguiar, 2002).

3. Capítulo 1

Avaliação comparativa dos sistemas de classificação de tumores mamários em cadelas por histomorfologia ou por graduação histológica

3.1. Resumo

Tumores mamários são muito comuns nas fêmeas caninas. Sendo assim, fatores prognósticos seguros são de grande importância para estimar o risco individual em consequência de um curso clínico desfavorável. A proposta do presente estudo foi aplicar dois métodos de classificação histológica para tumores mamários caninos, histologia descritiva revisada por Misdorp (2002) e corroborada pela OSM/AFIP e graduação histológica proposta por Elston & Ellis (1991). Isto foi aplicado em 87 casos diagnosticados como carcinomas mamários caninos, comparando-os, com o objetivo de evidenciar se ambos se equivalem, se contrapõem ou se completam, na comprovação do potencial maligno dos tumores. Todos os carcinomas complexos situaram-se nos graus I (75%; 24/32) e II (25%; 8/32). Já os carcinomas simples distribuíram-se pelos três graus (grau I 36,4% - 20/55; grau II 32,7% - 18/55; grau III 30,9% - 17/55). A análise dos subtipos revelou que os carcinomas tubulopapilares distribuíram-se pelos três graus (grau I 54,1% - 20/37; grau II 37,8% - 14/32; grau III 8,1% - 3/37). Já os carcinomas sólidos apresentaram 33,3% (3/9) no grau II, e 66,7% (6/9) no grau III. Nos carcinomas anaplásicos evidenciou-se 11,1% (1/9) no grau II, e 88,9% (8/9) no grau III. Conclui-se que os dois sistemas se complementam, mas a graduação histológica fornece informação mais adequada sobre o comportamento biológico destes neoplasmas.

Palavras-chave: neoplasma mamário. canino. morfológico-descritivo. graduação. comportamento biológico.

3.2. Introdução

Tumores mamários espontâneos são vistos freqüentemente em cães, gatos e humanos. São os neoplasmas mais comuns em fêmeas caninas (Loar, 1992; Simon et al., 2001; Pires et al., 2003; Mulas et al., 2005) com uma incidência de 105:100.000 (Hellmén et al., 2000). Todas as raças de cães podem ser afetadas, mas algumas possuem alta prevalência, como no caso das raças Dachshund e Pointer (Moulton, 1990; Yamagami et al., 1996a; Misdorp, 2002). Os neoplasmas geralmente ocorrem em média a partir da idade de 6-7 anos (Hellmén et al., 1993, 2000; Queiroga & Lopes, 2002; Misdorp, 2002; Pires et al., 2003), com rara ocorrência em cães com menos de 4 anos (De Nardi et al., 2002; Okamura et al., 2004).

Tumores malignos e benignos são freqüentemente diagnosticados, sendo que os malignos representam aproximadamente 50% de todos os tumores mamários caninos (Hellmén et al., 2000; Simon et al., 2001, Yazawa et al., 2001; Okamura et al., 2004). Estes podem ser únicos ou múltiplos, e variam tanto no seu tipo histológico, quanto na localização do sítio tumoral. Eles possuem uma morfologia histológica intrincada, pois podem gerar tumores epiteliais, mesenquimais e/ou mistos (Hellmén et al., 2000). Devido à sua heterogeneidade histomorfológica e apresentação clínica, a evidência histológica de malignidade não, invariavelmente, implica em um curso clínico maligno (Misdorp, 2002; Okamura et al., 2004; Mulas et al., 2005).

Sendo assim, fatores prognósticos seguros são de grande importância para estimar o risco individual em consequência de um curso clínico desfavorável. Existem muitos fatores prognósticos reconhecidos e bem aceitos para os tumores mamários caninos, tais como o tamanho do neoplasma, comprometimento dos linfonodos regionais, presença de metástases distantes, tipo histológico, grau de malignidade histológica e grau de diferenciação nuclear (Mulas et al., 2005).

A Organização Mundial de Saúde (OMS), propõe uma classificação para tumores, baseada na morfologia descritiva levando em consideração o potencial de malignidade destes neoplasmas. É sabido que, de acordo com a elevação deste potencial de malignidade, há uma redução considerável da taxa de sobrevivência dos animais (Misdorp et al., 1999).

A proposta do presente estudo foi aplicar dois métodos de classificação histológica para tumores mamários caninos, comparando-os, com o objetivo de evidenciar se ambos se equivalem, se contrapõem ou se completam, na determinação do potencial maligno dos tumores.

3.2. Materiais e Métodos

3.2.1. Amostras

Para a realização do presente trabalho foram resgatados 87 casos, oriundos de biópsias excisionais ou de necropsias, diagnosticados como carcinomas mamários caninos dos tipos simples e complexo. Destes 42 casos eram provenientes do laminário do Departamento de Patologia Animal da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), e os outros 45 casos foram recuperados dos arquivos do Laboratório Regional de Diagnóstico (LRD) da UFPel. Deste material incluso em parafina foram confeccionadas lâminas histológicas, coradas com hematoxilina-eosina como de rotina, para análise por microscopia óptica de luz.

3.2.2. Morfologia descritiva

Os carcinomas foram classificados de acordo com a descrição histológica para tumores mamários em caninos. Para isso utilizaram-se os critérios histológico-descritivos apresentados por Misdorp (2002) e apoiados pela Organização Mundial de Saúde/Instituto de Patologia das Forças Armadas Americanas (OMS/AFIP), que caracterizam os tumores com a seguinte ordem crescente de malignidade: carcinoma não infiltrativo (*in situ*), carcinoma complexo, carcinoma simples (subtipos tubulopapilar, sólido e anaplásico), carcinomas de tipos especiais (subtipos de células estreladas, com diferenciação escamosa, mucinoso e rico em lipídeos), sarcomas (subtipos fibrossarcoma, osteossarcoma, carcinosarcoma e outros sarcomas) e carcinoma ou sarcoma em tumor benigno.

3.2.3. Graduação histológica

A graduação histológica foi estabelecida de acordo com o sistema proposto por Elston & Ellis (1991) (Figura 1). Este sistema considera a formação tubular, o pleomorfismo nuclear e o índice mitótico. A graduação histológica é obtida pelo somatório dos pontos destes três parâmetros, e resulta em neoplasmas que são classificados como de grau I quando os escores resultantes da somatória ficam entre

3 e 5, de grau II quando os escores ficam entre 6 ou 7, e de grau III quando os escores ficam entre 8 ou 9.

Figura 1 – Resumo do método semi-quantitativo para avaliação do grau histológico em carcinomas mamários, proposto por Elston & Ellis (1991)

Aspecto	Escore
Formação tubular	
Boa formação tubular (acima de 75%)	1
Moderada formação tubular (entre 10 e 75%)	2
Pouco ou nenhuma formação tubular (10% ou menos)	3
Pleomorfismo nuclear	
Pequeno, células uniformes e regulares	1
Moderado aumento no tamanho e variabilidade celular	2
Marcada variação	3
Contagem mitótica	
0 – 7	1
8 – 16	2
maior que 17	3
Total do escore	
3 - 5	I
6 - 7	II
8 - 9	III

Fonte: Elston & Ellis (1991)

3.3. Resultados

3.3.1. Estudo histológico-descritivo

Do total de 87 amostras tumorais, 36,8% (32/87) eram de carcinomas complexos e 63,2% (55/87) carcinomas simples, de diferentes arranjos morfológicos. Os tumores simples foram classificados de acordo com o seu padrão morfológico, como tubulopapilar, sólido ou anaplásico. Dentre os carcinomas simples, encontrou-se 67,2% (37/55) carcinomas tubulopapilares, 16,4% (9/55) carcinomas sólidos e 16,4% (9/55) anaplásicos (Fig. 2).

3.3.2. Graduação dos tumores

Dos 87 casos selecionados, 50,6% (44/87) pertenciam ao grau I, 29,9% (26/87) como grau II e 19,5% (17/87) como grau III (Tab. 1). Dos 44 tumores classificados como grau I, nove possuíam escore 3, doze escore 4 e vinte e três tumores foram enquadrados no escore 5. Já dos tumores classificados como grau II, vinte obtiveram escore 6 e seis o escore 7. Dos tumores classificados com grau III, doze tumores foram categorizados com escore 8 e cinco receberam escore 9 (Fig. 3).

3.3.3. Descritivo morfológico x Graduação

Dos 32 tumores complexos, 24 apresentaram grau I de malignidade, e oito grau II. Chama-se à atenção para o fato de que entre os tumores complexos, dados como os de menor malignidade, não foram encontrados tumores grau III.

Dentre os carcinomas simples (55), 37 eram carcinomas tubulopapilares. Vinte destes foram classificados como grau I, 14 como grau II e 3 como grau III. Já os carcinomas sólidos totalizaram 9 casos, sendo 3 grau II e 6 grau III. Considerando os 9 tumores classificados como carcinomas anaplásicos, um foi classificado como grau II e oito grau III (Tab. 2, Fig. 4 e 5).

Tabela 1 – Graduação de 87 carcinomas mamários caninos pelo método de Elston & Ellis (1991)

Grau	Nº de casos (%)
I	44 (50,6%)
II	26 (29,9%)
III	17 (19,5%)
Total	87 (100%)

3.4. Discussão

O método de classificação morfológica revisado por Misdorp (2002), e apoiado pela OSM/AFIP, foi aplicado às 87 amostras selecionadas para este estudo. Destas, 63,2% (55/87) eram carcinomas simples e 36,8% (32/87) eram carcinomas complexos. Isto reflete o que é citado por outros autores que afirmam que, o carcinoma simples é o tumor mamário maligno mais comum no cão. Estes quando comparados com todos os outros carcinomas mamários combinados, possuem prognóstico desfavorável (Misdorp, 2002).

Karayannopoulou et al. (2005), relataram que de um total de 85 neoplasmas mamários caninos, classificados em carcinoma simples, carcinoma complexo, carcinoma de células estreladas e carcinoma em tumor benigno, 64,7% (55/85) eram carcinomas simples e 9,4% (8/85) eram carcinomas complexos. No presente estudo observou-se, porém, que houve uma distribuição mais uniforme entre os dois tipos histológicos diagnosticados. Isto, provavelmente, é explicado devido à diferença entre as quantidades de tumores simples (55) e complexos (32), comparadas com as obtidas por Karayannopoulou et al. (2005) (55 carcinomas simples e 8 carcinomas complexos).

Tabela 2 – Resumo comparativo da distribuição dos carcinomas mamários caninos, de acordo com parâmetros histológicos descritivos e graduação pelos critérios de Elston & Ellis (1991)

Tipos	Grau I			Grau II		Grau III		Total (%)
	3	4	5	6	7	8	9	
ESCORE	3	4	5	6	7	8	9	
Carcinoma complexo	5	6	13	6	2	-	-	32 (36,8%)
Carcinoma simples <i>Tubulopapilar</i>	4	6	10	11	3	3		37 (42,4%)
<i>Sólido</i>	-	-	-	3	-	5	1	9 (10,4%)
<i>Anaplásico</i>	-	-	-	-	1	4	4	9 (10,4%)
Total	9	12	23	20	6	12	5	87 (100%)

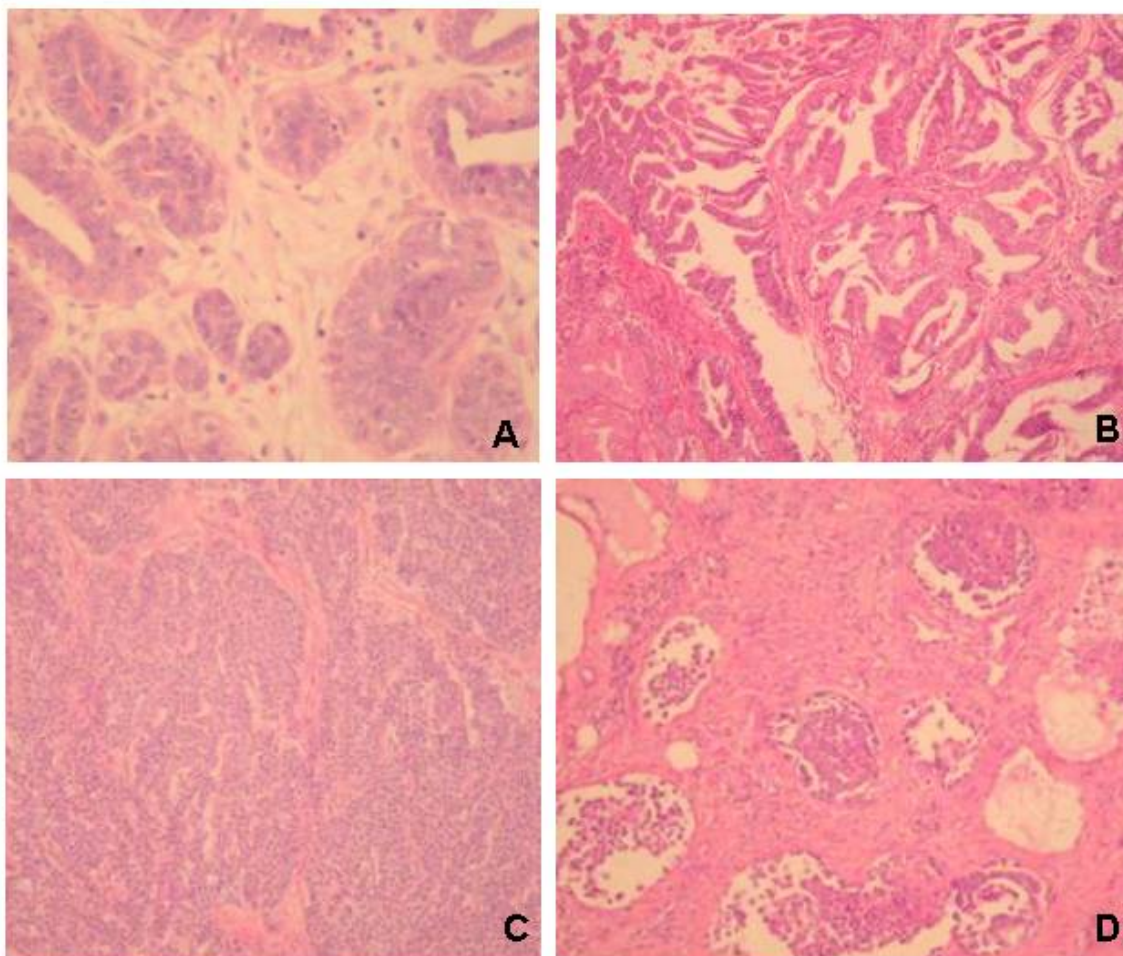


Figura 2 – Morfologia descritiva dos carcinomas mamários caninos: (A) carcinoma complexo, (B) carcinoma simples tubulopapilar, (C) carcinoma simples sólido, (D) carcinoma simples anaplásico

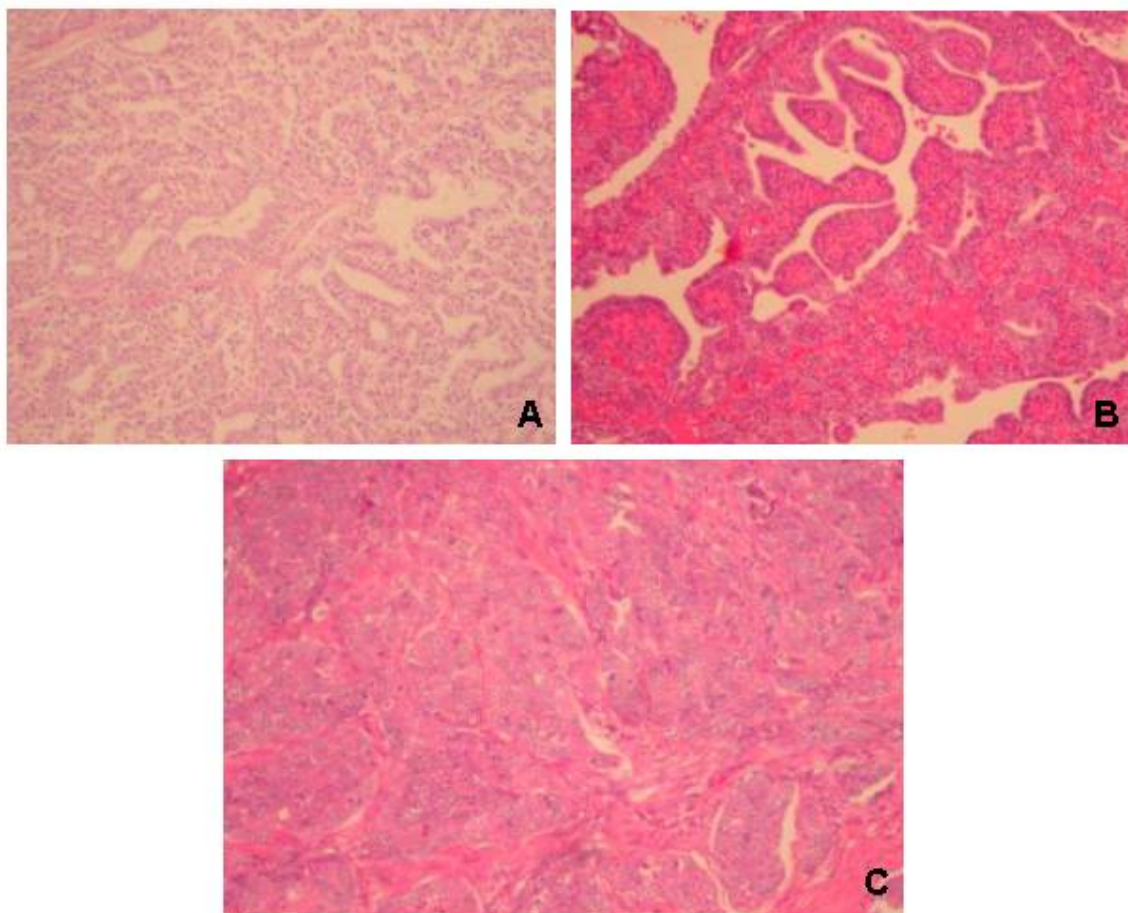


Figura 3 – Gradação histológica segundo o método de Elston & Ellis (1991) dos carcinomas mamários caninos: (A) carcinoma grau I, (B) carcinoma grau II, (C) carcinoma grau III

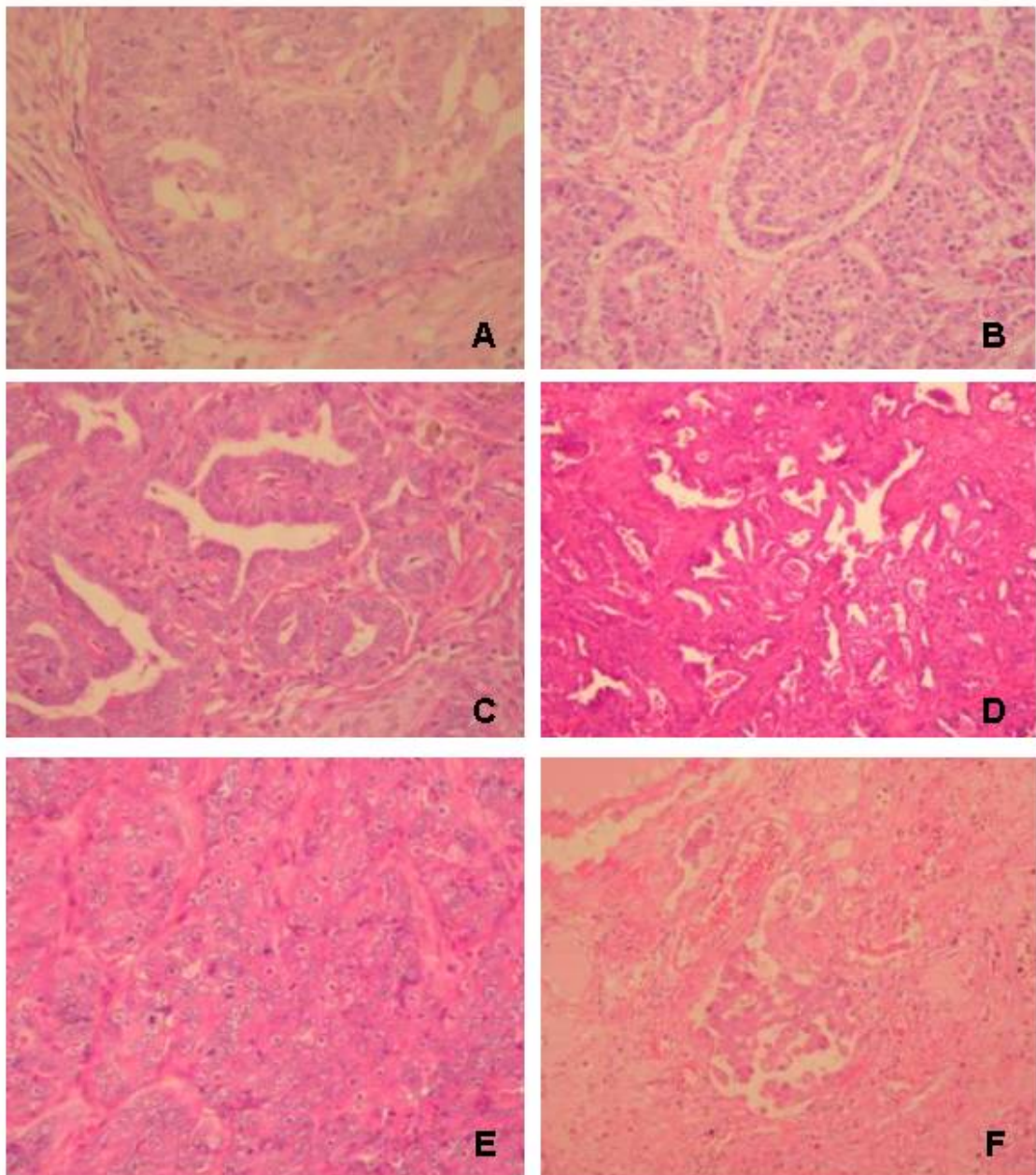


Figura 4 – Morfológico descritivo e graduação histológica dos carcinomas mamários: (A) carcinoma complexo grau II, (B) carcinoma simples tubulopapilar grau I, (C) carcinoma simples tubulopapilar grau II, (D) carcinoma simples tubulopapilar grau III, (E) carcinoma simples sólido grau III, (F) carcinoma simples anaplásico grau III

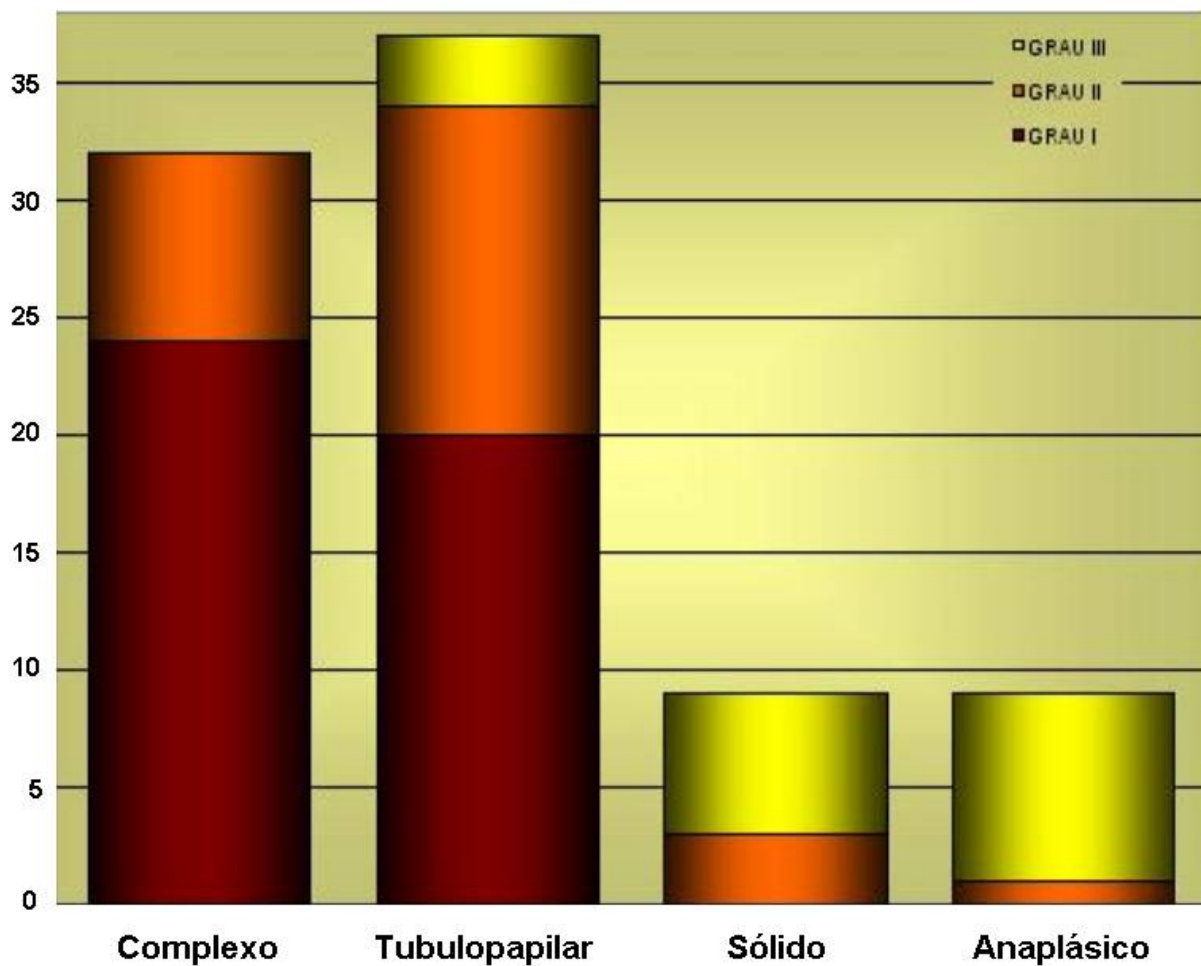


Figura 5 – Representação gráfica da distribuição dos diferentes tipos de carcinomas mamários caninos e seus respectivos graus de malignidade.

Ao avaliar-se somente os carcinomas simples, levando em consideração seus subtipos, observou-se que 67,2% (37/55) foram classificados como tubulopapilares. Eles ocorrem freqüentemente em cães (Misdorp, 2002), o que explica o alto número de casos encontrados, quando comparados com os demais subtipos. Os subtipos sólido e anaplásico, neste estudo, expressaram porcentagens iguais de 16,4% (9/55) cada. Estes dois subtipos de tumores simples são menos freqüentes em cães. Num estudo realizado por Pérez Alenza et al. (1997), o subtipo sólido foi o tumor que mais freqüentemente apresentou metástases. Já o carcinoma anaplásico possui um prognóstico pobre, porque freqüentemente recidiva e metastisa, sendo a remoção cirúrgica a única forma de tratamento e ainda de caráter questionável (Misdorp, 2002).

Todos os 87 tumores mamários foram graduados de acordo com o sistema proposto por Elston & Ellis (1991). A maioria destes, 50,6% (44/87), foram classificados como grau I, 29,9% (26/87) como grau II e apenas 19,5% (17/87) como grau III. Dutra et al. (2004), aplicaram em 42 tumores mamários caninos, graduação histológica e expressão imunoistoquímica de c-erbB-2. Neste estudo 28,6% (12/42) dos tumores foram classificados como grau I, 42,8% (18/42) como grau II, e 28,6% (12/42) como grau III. Do total de tumores, 30,9% (13/42) foram também positivos para o c-erbB-2.

No câncer mamário humano a graduação histológica e a expressão do c-erbB-2 tem sido correlacionada com o prognóstico. Estudos sobre o c-erbB-2 tem mostrado que este proto-oncogene, responsável pela regulação da proliferação celular, está envolvido na carcinogênese dos tumores mamários. Ele também está associado a um prognóstico pobre e ao decréscimo do tempo de vida livre da doença neoplásica (Dutra et al., 2004). Na espécie canina é descrita uma super expressão do c-erbB-2 correlacionada como diagnóstico histopatológico de malignidade, mas não com a presença de invasão local ou doença metastática regional (Cassali, 2000).

Karayannopoulou et al. (2005), ao aplicarem este sistema de graduação histológica, encontraram uma distribuição homogênea entre os graus. Do total de 85 carcinomas, 31,8% (27/85) foram classificados como grau I, 32,9% (28/85) como grau II e 35,3% (30/85) como grau III. Estes resultados

diferem dos encontrados pelo presente estudo, onde o grau I contemplou o maior número de casos, e o grau III o menor.

O escore de um neoplasma é baseado no grau de diferenciação da célula neoplásica, e no número de figuras mitóticas do tumor, características correlacionadas com a agressividade do tumor. Critérios para o escore dos tumores mamários não são usados sistematicamente em patologia veterinária, o que dificulta muito a predição prognóstica de certos tumores (Ferreira et al., 2003). No presente estudo ao analisar-se os escores, foi observado que a maioria dos tumores, 49,4% (43/87), encontrava-se concentrada entre os escores 5 e 6, que são os escores limítrofes entre os graus I e II, e o restante estava distribuído, de forma mais proporcional, entre os outros escores.

Quando se compararam os dois sistemas de classificação, histologia-descritiva e grau de malignidade histológica, observou-se que todos os carcinomas complexos estavam localizados nos graus I (75%; 24/32) e II (25%; 8/32). Os dados encontrados por Karayannopoulou et al. (2005), mostram uma distribuição dos carcinomas complexos, semelhante à nossa, no qual 87,5% (7/8) foram classificados como grau I, apenas 12,5% (1/8) como grau II e nenhum como grau III. Foi então verificado que, os carcinomas complexos realmente possuem baixo grau de malignidade (Misdorp, 2002).

Os carcinomas simples distribuíram-se de forma proporcional pelos três graus, com 36,4% (20/55) no grau I, 32,7% (18/55) no grau II e 30,9% (17/55) no grau III. Esta distribuição diferiu da encontrada em Karayannopoulou et al. (2005). Naquele estudo, numa amostra de 55 tumores, somente 18,2% (10/55) foram classificados como grau I, 30,9% (17/55) como grau II e 50,9% (28/55) como grau III.

Quando foram analisados os carcinomas simples, levando em consideração seus subtipos juntamente com a graduação histológica, evidenciou-se que os carcinomas tubulopapilares distribuíam-se pelos três graus. Ocorreram principalmente no grau I com 54,1% (20/37), seguida por 37,8% (14/37) no grau II e 8,1% (3/37) no grau III. Isto reforça o fato já citado que, dentre os carcinomas simples, o tubulopapilar é o tipo histológico considerado de menor malignidade (Misdorp, 2002). Tanto carcinomas anaplásicos, como os sólidos, não classificaram dentro do grau I, mas a sua distribuição nos outros graus diferiu. Os carcinomas sólidos ficaram distribuídos

nos graus II (33,3%; 3/9), e III (66,7%; 6/9). Já os carcinomas anaplásicos foram observados nos graus II com 11,1% (1/9), e no grau III com 88,9% (8/9). Os resultados encontrados traduzem o que já foi citado pela literatura, ou seja, que estes dois últimos subtipos histológicos de carcinomas simples são os de maior potencial maligno (Misdorp, 2002).

Ao levar em conta somente os escores, observou-se que nos carcinomas complexos os escores variaram de 3 a 7, contemplando os graus I e II, e o maior número de casos encontravam-se dentro do escore 5 (13/32), seguido pelos escores 4 (6/32) e 6 (6/32). Cabe aqui ressaltar que os escores 4 e 5 contemplam o grau I. Isto leva a crer que os tumores complexos tendem a manifestar características histomorfológicas correspondentes a um grau de malignidade que representaria um prognóstico mais favorável ao paciente se comparados com outros tumores mamários malignos, como é o caso dos carcinomas simples.

Quando foram avaliados os tumores simples, tendo como base os escores obtidos, foi observado que este tipo de tumor expressou escores que variavam de 3 a 9, contemplando os três graus de malignidade. A maioria dos casos concentrou-se, em ordem decrescente nos escores 6 (14/55), escore 8 (12/55) e escore 5 (10/55). Ressalta-se que o escore 6 é o primeiro escore pertencente ao grau II e o escore 8 o primeiro do grau III. Verifica-se que os carcinomas simples tendem a mostrar um alto grau de malignidade histológica, conferindo a este tipo de tumor um prognóstico desfavorável.

Ao analisar os escores de acordo com os diferentes subtipos histológicos de carcinomas simples, evidenciou-se que os do tipo tubulopapilar possuíam escores de 3 a 8, sendo que o escore 6 (11/37) ocorre no maior número de casos, seguido pelo escore 5 (10/37). Estes dois escores são os limítrofes dos graus I e II, sugerindo que neste caso o valor do escore transmitiria o potencial de malignidade do tumor de forma mais fidedigna, do que quando se observa somente o grau de malignidade.

O subtipo sólido revelou escores de 6 a 9, onde o escore 8 (5/9) englobou o maior número de casos, seguido pelo escore 6 (3/9). Isto reflete a tendência deste tumor para um prognóstico desfavorável. Nos carcinomas anaplásicos, os escores variaram de 7 a 9, sendo que os escores 8 e 9 expressaram um total de quatro casos cada. Estes dois escores pertencem ao

grau III, demonstrando que este tipo de carcinoma simples é o que possui o pior prognóstico, quando comparado com os outros tipos de carcinomas mamários, tendo como base este sistema de classificação.

Karayannopoulou et al. (2005), em seu estudo, avaliaram os animais durante um período de 2 anos após a mastectomia inicial. Neste caso, a morte pelo neoplasma ou por eutanásia devido a metástases, foi de 45,9% (39/85). Destes animais, 94,9% (37/39) eram carcinomas simples, e nenhum era do tipo complexo. Quando avaliada a graduação dos tumores e a taxa de sobrevivência neste estudo, 46,4% (13/28) dos tumores eram classificados como grau II e 86,7% (26/30) eram grau III. Nenhum paciente de grau I morreu no período do estudo. Isto revela que há um aumento no risco de morte para pacientes com graus II e III, quando comparados com pacientes de grau I.

Os dados obtidos neste estudo revelaram que, quando se classificam tumores de mama caninos, a distinção entre os tipos complexo e simples é importante, por esses dois tipos possuírem diferenças prognósticas relevantes (Misdorp & Hart, 1979; Yamagami et al., 1996b; Benjamin et al., 1999; Misdorp, 2002). Isto fica evidente quando estes tumores são submetidos aos sistemas de graduação histológica, onde a maioria destes ficou distribuída pelo grau I, e o carcinoma complexo foi seu maior representante. Mas, ao observarmos somente os carcinomas simples nota-se que estes contemplaram os três graus, sendo que o grau III foi representado principalmente pelos carcinomas sólido e anaplásico. Já os tubulopapilares, por terem demonstrado uma distribuição mais homogênea pelos três graus deste sistema, revelou que a análise de seu escore mostra de forma mais clara, o potencial de malignidade das amostras estudadas. Isto torna-se mais evidente quando nos deparamos com os escores 6 e 8, escores estes que englobam o maior número de casos, reforçando que este tumor é o menos maligno dos carcinomas simples (Misdorp, 2002).

Com os dados obtidos neste trabalho observa-se a necessidade deste ser complementado com estudos prospectivos de avaliação da sobrevivência dos pacientes, frente ao tipo de tumor e grau que estes apresentam, para assim poder-se realmente avaliar a importância prognóstica destes métodos de classificação histológica para tumores mamários caninos.

A maioria dos estudos prognósticos tem sido baseados em grupos de cães e seus tumores, embora a significância prognóstica das mesmas variáveis

não seriam necessariamente aplicadas para cada caso individual. Isto defende que o relato do patologista deve incluir o diagnóstico (tipo histológico do tumor) e outros fatores de significância prognóstica, tais como o grau de malignidade histológica (grau I, grau II e grau III), grau de infiltração e invasão vascular (Misdorp, 2002).

3.5. Conclusões

Com este estudo conclui-se que estes dois sistemas se complementam, sendo importante seu uso concomitante. Porém, a realização isolada da graduação histológica forneceu maiores informações sobre o possível comportamento biológico destes neoplasmas. Isto principalmente quando observamos a distribuição dos carcinomas simples, subtipo tubulopapilar, neste sistema, pois este contemplou os três graus de malignidade, revelando uma grande variação na sua apresentação histológica.

3.6. Referências

- BENJAMIN, S. A.; LEE, A. C.; SAUNDERS, W. J. Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles. **Veterinary Pathology** v. 36, p.423 - 436, 1999.
- CASSALI, G. D., **Estudo morfológico, imuno-histoquímico e citométrico de tumores mamários da cadela – Aspectos comparativos com neoplasias da mama humana.** Belo Horizonte, 2000. 80f. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.
- DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; SOUSA, R. S.; COSTA, T. A.; MACEDO, T. R.; RODIGHIERI, S. M.; RIOS, A.; PIEKARZ, C. H. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal do Paraná. **Archives of Veterinary Science** v. 7, p.15 – 26, 2002.
- DUTRA, A. P.; GRANJA, N. V. M.; SCHMITT, F. C.; CASSALI, G. D. c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. **Braz J Med Biol Res** v. 37, p.1673 – 1681, 2004.
- ELSTON, C. W. & ELLIS, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology** v. 19, p.403 – 410, 1991.
- FERREIRA, E.; BREGUNCI;G. C., SCHMITT; F. C., CASSALI, G.D. Protocol for the anatomopathological examination of canine mammary tumors. **Arq Bras Med Vet Zootec** v. 55, p.105 - 109, 2003.
- HELLMÉN, E.; BERGSTRÖM, R.; HOLMBERG, L.; SPANGBERG, I. B.; HANSSON, K.; LINDGREN, A. Prognostic factors in canine mammary

- tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. **Veterinary Pathology** v. 30, p.20 – 27, 1993.
- HELLMÉN, E.; MOLLER, M.; BLANKENSTEIN, M. A.; ANDERSSON, L.; WESTERMARK, B. Expression of different phenotypes in cell lines from canine mammary spindle-cell tumours and osteosarcomas indicating a pluripotent mammary stem cell origin. **Breast Cancer Research and Treatment** v. 61, p.197 - 210, 2000.
- Instituto de Patologia das Forças Armadas Americanas. Disponível em : www.afip.org/vetpath/who/whomamm.htm Acesso em 22 de maio de 2005.
- KARAYANNOPOULOU, M.; KALDRYMIDOU, E.; CONSTANTINIDIS, T. C.; DESSIRIS, A. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. **J Comp Path** v. 133, p.246 – 252, 2005.
- LOAR, A. S.: Tumores do Sistema Genital e Glândulas Mamárias In: **ETTINGER, S. J.** Tratado de Medicina Interna Veterinária. São Paulo: Editora Manole Ltda, 3ª ed., 1992, p.1900 - 1906.
- MISDORP, W. & HART, A. A. M. Canine mammary cancer I. Prognosis **J Small Anim Pract** v. 20, p.385 – 394, 1979.
- MISDORP, W.; ELSE, R.W.; HELLMÉN, E. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. World Health Organization. Washington, D.C., v.7, p.59, 1999.
- MISDORP, W. Tumors of the Mammary Gland. In: **MEUTEN, D. J.** Tumors in Domestic Animals. Iowa: Editora Iowa State Press, 4ª ed., 2002, p. 575 - 606.
- MOULTON, J. E. Tumors of the mammary gland. In: **MOULTON, J.E.** Tumors in domestic animals. Berkley: University of California, 3ª ed., 1990, p.518 - 552.
- MULAS, J. M. de las; MILLÁN, Y.; DIOS, R. A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor α and progesterone receptor expression and host and tumor factor as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. **Veterinary Pathology** v. 42, p.200 - 212, 2005.
- MONLUX, A. W.; ROSZEL, J. F.; MACVEAN, D. W.; PALMER, T. W. Classification of epithelial canine mammary tumors in a defined population. **Veterinary Pathology** v. 14, p.194 – 217, 1977.
- OKAMURA, Y.; HARAGUCHI, T.; MORIMOTO, M.; OKURA, M.; UNE, S.; NAKAICHI, M.; TAURA, Y. Expression of a tumor-associated antigen, RCAS1, in canine mammary tumors. **J Vet Med Sci** v. 66, p.651-658, 2004.
- PÉREZ ALENZA, M. D.; PEÑA, L.; NIETO, A. I; CASTEÑO, M. Clinical and pathological prognostic factors in canine mammary tumours. **Ann Ist Super Sanità** v. 33, p.581 – 585, 1997.
- PINDER, S. E.; ELLIS, I. O.; LESTÓN, C. W. Prognostic factors in primary breast carcinoma **J Clin Pathol** v. 48, p.981 – 983, 1995.

- PIRES, M. A.; TRAVASSOS, F. S.; PIRES, I. Neoplasias em canídeos – Um estudo descritivo de 6 anos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias** v. 98, p.111 – 118, 2003.
- QUEIROGA, F. & LOPES, C. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos factores de prognóstico. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias** v. 97, p.119 – 27, 2002.
- SIMON, D.; KNEBEL, J. W.; BAUMGÄRTNER, W.; AUFDERHEIDE, M.; MEYER-LINDENBERG, A.; NOLTE, I. In vitro efficacy of chemotherapeutics as determined by 50% inhibitory concentrations in cell cultures of mammary gland tumors obtained from dogs. **American Journal of Veterinary Research** v. 62, p. 1825 - 1830, 2001.
- YAMAGAMI, T.; KOBAYASHI, T.; TAKAHASHI, K.; SUGIVAMA, M. Influence of ovariectomy at the time of mastectomy on the prognosis for canine malignant mammary tumours. **British Small Animal Veterinary Association** v. 37, p.462 – 464, 1996a.
- YAMAGAMI, T.; KOBAYASHI, T.; TAKAHASHI, K.; SUGIVAMA, M. Prognosis for malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification **J Vet Med Sci.** v. 58, p.1079 - 1083, 1996b.
- YAZAWA, M.; OKUDA, M.; SETOGUCHI, A.; IWABUCHI, S.; NISHIMURA, R.; SASAKI, N.; MASUDA, K.; OHNO, K.; TSUJIMOTO, H.; Telomere length and telomerase activity in canine mammary gland tumors. **A J V R** v. 62, p.1539 – 1543, 2001.

4. Capítulo 2

Avaliação do uso da AgNOR como ferramenta prognóstica para tumores mamários caninos

4.1. Resumo

Atualmente existem muitas tentativas para otimizar a classificação de tumores mamários caninos visando determinar seu comportamento biológico, pelo fato destes serem muito comuns em cães. Vários estudos têm revelado uma correlação significativa entre o valor de AgNOR e a taxa de sobrevivência do paciente. O presente trabalho teve como objetivo verificar se existe correlação entre os índices de AgNOR, e o potencial de malignidade dos tumores mamários caninos, definido por dois métodos tradicionais de classificação, histologia descritiva revisada por Misdorp (2002) e apoiada pela OSM/AFIP e graduação histológica proposto por Elston & Ellis (1991). Para o estudo foram selecionados 45 carcinomas, dos tipos simples e complexo e 4 adenomas mamários caninos. Ao aplicar a técnica de AgNOR obteve-se uma média de 2,23 AgNORs/núcleo (amplitude 1,39 - 3,2). Quando avaliados utilizando morfologia-descritiva, evidenciou-se que os valores médios de AgNOR eram menores em adenomas complexos (média 1,95; amplitude 1,39 – 2,26) e em carcinomas complexos (média 1,97; amplitude 1,84 – 2,35) que em carcinomas simples (média 2,35; amplitude 1,72 – 3,2). Já o subtipo tubulopapilar apresentou valores médios inferiores (média 2,19; amplitude 1,72 - 3,2) aos subtipos sólido (média 2,44; amplitude 1,96 – 2,86) e anaplásico (média 2,51; amplitude 1,92 – 3,11). Ao analisar os 45 carcinomas, considerando o sistema

de graduação histológica, percebeu-se que os tumores classificados como grau I apresentavam média inferior de AgNOR/núcleo (média 1,99; amplitude 1,73 – 2,7), que os classificados como grau II (média 2,25; amplitude 1,72 – 3,2) e grau III (média 2,51; amplitude 1,92 – 3,11). Os resultados foram estatisticamente significativos. Com este estudo pode-se concluir que a média de AgNOR/núcleo tende a elevar-se em tumores que apresentem características histológicas de malignidade.

Palavras-chave: neoplasia mamária. canino. morfológico-descritivo. graduação. AgNOR. comportamento biológico.

4.2. Introdução

Em medicina veterinária os fatores preditivos para tumores, tais como, comportamento biológico, avaliação anatomopatológica, comprometimento dos linfonodos e tamanho tumoral não estão ainda bem fundamentados (Hellmén et al., 1993; Harvey et al., 1995; van Diest et al., 2004). As características clínicas e histopatológicas dos tumores mamários são extremamente variáveis, observando-se desde nódulos de aparência benigna até grandes massas com características malignas (Pérez Alenza et al., 1997). A maior dificuldade clínica está no prognóstico pós-cirúrgico preciso, o qual deve-se basear em várias características relacionadas ao paciente e ao tumor (Karayannopoulou et al., 2005).

Uma das características mais importantes da transformação neoplásica é o descontrole do ciclo celular, e esta alteração está também envolvida na expansão clonal de uma população tumoral maligna (Ceccarelli et al., 2000; Korneyev et al., 2000). Este aspecto é considerado como uma das maiores e mais poderosas ferramentas para se prever o comportamento neoplásico (Ceccarelli et al., 2000).

Métodos que avaliam a proliferação celular têm sido desenvolvidos e empregados. Eles incluem contagem mitótica, quantificação da fração celular na fase S, por citometria de fluxo, e detecção imunistoquímica de moléculas relacionadas ao ciclo celular, tais como o Ki-67/MIB1 e o PCNA (Tateishi et al., 1995; Ceccarelli et al., 2000; Derenzini, 2000; Lorenzato et al., 2000).

Além destes, a avaliação quantitativa das proteínas associadas às regiões organizadoras nucleolares (NORs) coradas pela prata (Ag) (Löhr et al.,

1997; Ceccarelli et al., 2000; Derenzini, 2000; Treré, 2000; Yazdi & Taghavi, 2005) foi introduzida como um indicador da atividade proliferativa da célula neoplásica (Crocker et al., 1989; Ceccarelli et al., 2000; Oshima & Fonores, 2001). Este método vem sendo usado para identificar o estágio do ciclo celular e para medir a atividade mitótica da célula (Crocker et al., 1989; Piffiko et al., 1997b; Sfacteria et al., 2003).

Vários estudos têm revelado uma correlação significativa entre, o valor da AgNOR e a sobrevida do paciente, em uma grande variedade de cânceres humanos. Foi observado que o maior valor da AgNOR corresponde a um pior prognóstico (Pich et al., 2000). Esta correlação é explicada com base na função biológica das AgNORs. Estudos *in vitro* e *in vivo* tem mostrado que, a quantidade de AgNOR é diretamente relacionada à velocidade de biogênese ribossomal, a qual, em proliferação celular, está relacionada à duração do ciclo (Derenzini et al., 2004). Por ser a velocidade de crescimento da massa tumoral o fator mais importante que influencia o curso clínico do câncer, o crescimento mais rápido sugeriu a explicação de pior prognóstico de cânceres com altos valores de AgNOR, comparado com outros que possuam baixos valores (Derenzini, 2000).

A técnica de AgNOR é simples, de fácil interpretação, absorve pouco tempo de trabalho, apresenta custos relativamente baixos e pode ser padronizada com razoável facilidade (Crocker & Skilbeck, 1987; Derenzini, 2000), sendo, então, facilmente incorporada à rotina laboratorial.

O presente trabalho teve como objetivo verificar se existe correlação entre os índices de AgNOR e o potencial de malignidade dos tumores mamários caninos, definido pelos métodos tradicionais de classificação.

4.3. Materiais e métodos

4.3.1. Amostras

Para o estudo 45 carcinomas, dos tipos simples e complexo, e 4 adenomas complexos mamários caninos, provenientes de biopsias excisionais ou de necropsias, foram recuperados dos arquivos do Laboratório Regional de Diagnóstico (LRD) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

4.3.2. Avaliação histológica

4.3.2.1. Método de AgNOR

Utilizou-se material incluso em parafina, do qual foram confeccionadas lâminas histológicas para análise por microscopia óptica de luz.

A partir do material incluso em parafina, foram obtidos cortes de 5 µm de espessura. Estes foram desparafinados e hidratados em água deionizada. Posteriormente foram colocados em uma solução de gelatina a 2% e ácido fórmico a 1% em água deionizada e solução de nitrato de prata a 50%, na proporção de 1:2. As lâminas ficaram imersas nessa solução durante 45 minutos em estufa a 37°C. Após foram lavadas em água deionizada por 1 minuto, desidratadas, clarificadas e montadas com resina sintética (Simões et al., 1994; Kravis et al., 1996; Valdovich et al., 2004) (Apendice).

Para definir a freqüência de AgNOR, foram contados os pontos marrom-acastanhados no interior dos núcleos em 100 células epiteliais tumorais, distribuídas em 5 campos aleatórios na periferia do tumor, em objetiva de 100x com o auxílio do óleo de imersão. A freqüência AgNOR/núcleo de cada tumor mamário avaliado foi obtido dividindo-se o número total de AgNORs por 100 (Kravis et al., 1996).

4.3.2.2. Método Morfológico descritivo e graduação dos tumores

Para a análise da morfológica descritiva, foram confeccionadas lâminas histológicas, coradas com hematoxilina-eosina. Tomou-se como base o método de classificação, apresentado por Misdorp (2002) e apoiado pela Organização Mundial de Saúde/Instituto de Patologia das Forças Armadas Americanas (OMS/AFIP). Este sistema classifica os tumores benignos em adenoma (subtipos simples, complexo e basalóide), fibroadenoma (subtipos baixa e alta celularidade), tumor benigno misto e papiloma ductal. E os tumores malignos são classificados, seguindo a ordem crescente de malignidade: carcinoma não infiltrativo (*in situ*), carcinoma complexo, carcinoma simples (subtipos tubulopapilar, sólido e anaplásico), carcinomas de tipos especiais (subtipos de células estreladas, com diferenciação escamosa, mucinoso e rico em lipídeos), sarcomas (subtipos fibrossarcoma, osteossarcoma, carcinosarcoma e outros sarcomas) e carcinoma ou sarcoma em tumor benigno.

A graduação histológica foi realizada em secções coradas com hematoxilina-eosina considerando o método de Elston & Ellis (1991) (Figura 1). Para cada característica foi atribuída pontuação que variou de 1 a 3. Os escores foram obtidos através do somatório destes pontos, onde os escores de 3 a 5 encontravam-se dentro do grau I, os escores de 6 a 7 dentro do grau II e os escores de 8 a 9 dentro do grau III.

Figura 1 – Resumo do método semi-quantitativo para avaliação do grau histológico em carcinomas mamários como proposto por Elston & Ellis (1991)

Aspecto	Escore
Formação tubular	
Boa formação tubular (acima de 75%)	1
Moderada formação tubular (entre 10 e 75%)	2
Pouca ou nenhuma formação tubular (10% ou menos)	3
Pleomorfismo nuclear	
Pequeno, células uniformes e regulares	1
Moderado aumento no tamanho e variabilidade celular	2
Marcada variação	3
Contagem mitótica	
0 – 7	1
8 – 16	2
maior que 17	3
Total do escore	Grau de malignidade
3 - 5	I
6 - 7	II
8 - 9	III

Fonte: Elston & Ellis (1991)

4.3.3. Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o programa Statisticx (Statistix. 2003. Statistix 8 analytical software. Tallahassee, FL). Foram realizadas comparações entre os valores de AgNOR/núcleo encontrados nos 49 tumores e os métodos de classificação histológica utilizados no estudo. Para tal escolheu-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para amostras independentes, pelo fato dos dados não apresentarem uma distribuição normal (Fig. 1). Esta prova estatística é usada para verificar se as amostras independentes diferem entre si, e é válida para variáveis, no mínimo, em escala ordinal. O procedimento usado na prova de Kruskal-Wallis consiste, basicamente, em substituir o valor da variável original (média de AgNORs/núcleo) pelo posto obtido na distribuição conjunta dos escores das amostras.

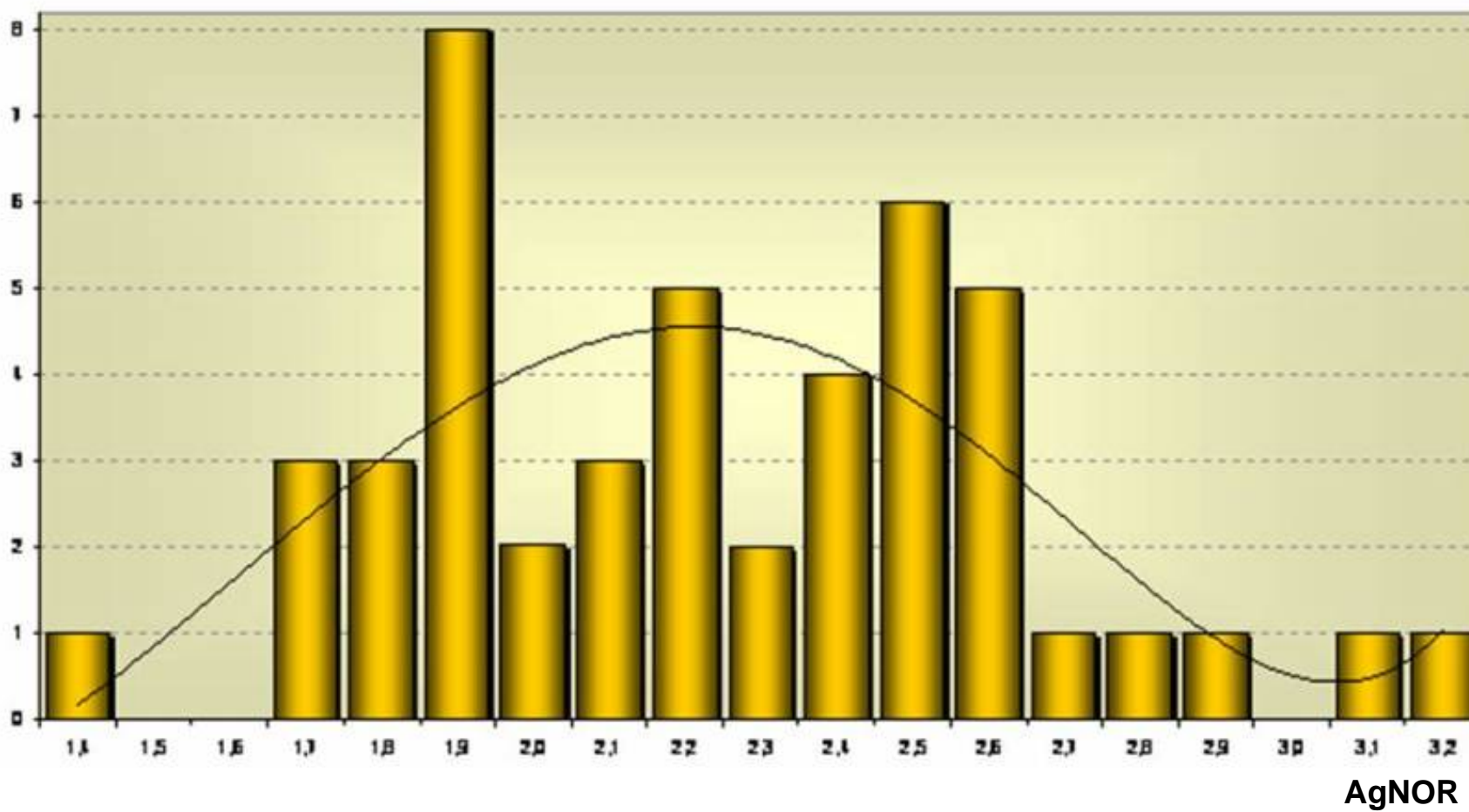


Figura 2 – Distribuição das médias de AgNOR/núcleo dos tumores mamários caninos

4.4. Resultados

4.4.1. Método de AgNOR

A contagem de AgNORs/núcleo, dos 49 tumores mamários caninos selecionados, variaram de 1,39 a 3,2, com a média geral de 2,23 (DP \pm 0,38). Adenomas compreenderam um intervalo de 1,39 a 2,26 (média 1,95) e carcinomas obtiveram média de 2,26 com amplitude de 1,72 a 3,2.

4.4.2. Histológico descritivo e graduação dos tumores

Dos 49 tumores selecionados para o estudo, 8,2% (4/49) eram adenomas complexos, 22,5% (11/49) eram carcinomas complexos e 69,3% (34/49) eram carcinomas simples de diferentes arranjos morfológicos. Os tumores simples foram classificados seguindo o seu padrão morfológico, sendo 50% (17/34) carcinomas tubulopapilares, 23,5% (8/34) carcinomas sólidos e 26,5% (9/34) carcinomas anaplásicos.

Do total de 45 carcinomas mamários, treze foram classificados com grau I, 17 com grau II e 15 com grau III.

4.4.3. Método de AgNOR x histológico-descritivo

Utilizando o método de classificação histológico descritivo, as contagens de AgNORs/núcleo revelaram uma distribuição crescente. Os 4 adenomas complexos mostraram uma amplitude de 1,39 a 2,26 (média 1,95; DP \pm 0,39) AgNORs/núcleo. Já os 11 casos de carcinomas complexos apresentaram uma variação de 1,85 a 2,35 (média 1,97; DP \pm 0,16). Os 34 carcinomas simples revelaram uma distribuição de 1,72 a 3,2 (média 2,35; DP \pm 0,38) AgNORs/núcleo (Tab. 1).

Os carcinomas simples quando classificados de acordo com os seus subtipos demonstraram diferentes disposições em suas contagens. Os valores de AgNORs/núcleo dos dezessete carcinomas simples tubulopapilares variaram de 1,72 a 3,2 (média 2,19; DP \pm 0,41). Já os oito carcinomas simples sólidos apresentaram valores entre 1,96 a 2,86 (média 2,44; DP \pm 0,27), e os valores dos nove carcinomas simples anaplásicos ficaram entre 2,31 a 3,11 (média 2,59; DP \pm 0,24) (Tab. 2).

Tabela 1 – Contagem de AgNORs/núcleo dos 49 tumores, de acordo com sua classificação morfológica descritiva

TIPO	Nº de casos (%)	Amplitude de AgNORs/núcleo (média ± DP)
ADENOMA COMPLEXO	04 (8,2%)	1,39 – 2,26 (1,95 ± 0,39)
CARCINOMA COMPLEXO	11 (22,5%)	1,84 – 2,35 (1,97 ± 0,16)
CARCINOMA SIMPLES	34 (69,3%)	1,72 – 3,2 (2,35 ± 0,38)
Total	49 (100%)	1,39 – 3,2 (2,23 ± 0,38)

Tabela 2 – Contagem de AgNORs/núcleo dos 49 tumores, de acordo com sua classificação morfológica descritiva e respectivos subtipos histológicos

TIPO		Nº de casos (%)	Amplitude de AgNORs/núcleo (média ± DP)
ADENOMA COMPLEXO		04 (8,2%)	1,39 – 2,26 (1,95 ± 0,39)
CARCINOMA COMPLEXO		11 (22,5%)	1,84 – 2,35 (1,97 ± 0,16)
CARCINOMA SIMPLES	Tubulopapilar	17 (34,7%)	1,72 – 3,2 (2,19 ± 0,41)
	Sólido	08 (16,3%)	1,96 – 2,86 (2,44 ± 0,27)
	Anaplásico	09 (18,3%)	2,31 – 3,11 (2,59 ± 0,24)
Total		49 (100%)	1,34 – 3,2 (2,23 ± 0,38)

4.4.4. Método de AgNOR x graduação histológica

As contagem de AgNORs também foram avaliadas de acordo com o método de graduação histológica. Os treze carcinomas classificados como de grau I possuíam valores de AgNORs/núcleo que variaram de 1,73 a 2,7 (média 1,99; DP \pm 0,27). Os dezessete carcinomas classificados com grau II tiveram uma variação da contagem AgNORs/núcleo de 1,72 a 3,2 (média 2,25; DP \pm 0,39), e os valores dos quinze carcinomas classificados com grau III variaram de 1,92 a 3,11 (média 2,51; DP \pm 0,27) (Tab. 3).

Tabela 3 - Contagem de AgNORs/núcleo dos 45 carcinomas, de acordo com sua graduação histológica

GRAU	Nº de casos	Amplitude de AgNORs/núcleo (média \pm DP)
I	23	1,73 – 2,7 (1,99 DP \pm 0,27)
II	17	1,72 – 3,2 (2,25 DP \pm 0,39)
III	15	1,92 – 3,11 (2,51 DP \pm 0,27)
Total	45	1,72 – 3,2 (2,26)

4.4.5. Análise estatística

A análise dos dados foram estatisticamente significativas. As comparações foram realizadas entre os tumores: adenomas complexos e os carcinomas simples e complexos ($P < 0,0028$); entre os carcinomas complexos e os subtipos de carcinomas simples tubulopapilar, sólido e anaplásico ($P < 0,0001$) e entre os carcinomas grau I, grau II, grau III ($P < 0,0003$).

4.5. Discussão

A anatomia patológica desempenha um papel fundamental na pesquisa de características histológicas. Estas, associadas às informações provenientes de um exame clínico sistemático, poderão fornecer dados essenciais para o estadiamento dos neoplasmas, estabelecimento do prognóstico e da terapêutica dos tumores (Pires et al., 2003).

O interesse dos patologistas nas proteínas AgNORs aumentou muito por volta do final dos anos 80 (Ploton et al., 1986; Treré, 2000). Alguns estudos demonstram que, o número de AgNORs é mais alto em células neoplásicas malignas do que em células neoplásicas benignas ou em células normais

(Ploton et al., 1986; Beer et al., 1992; Derenzini et al., 1993; Sfacteria et al., 2003). Esta relação número de NORs e atividade mitótica é apresentada por vários trabalhos, que verificaram a correlação positiva entre o aumento do número de NORs e outros parâmetros de avaliação da proliferação celular, como o Ki-67 e o PCNA (Crocker, 1996; Derenzini, 2000).

Por esta razão a técnica de AgNOR tem sido usada para estimar o comportamento biológico de vários neoplasmas, ou seja, carcinomas que apresentam NORs menores e múltiplos, comportam-se com maior grau de malignidade (Crocker, 1996; Derenzini, 2000).

Existem relatos de que a contagem das AgNORs possui significado prognóstico em vários tipos de tumores humanos e caninos, tais como: linfoma não-Hodgkin humano (Yazdi & Taghavi, 2005), carcinoma de esôfago humano (Kuwano et al., 1995), mastocitoma canino (Simões et al., 1994; Kravis et al., 1996), adenocarcinoma gástrico humano (Oshima & Forones, 2001) e adenocarcinoma pulmonar humano (Tateishi et al., 1995). Em outros estudos a contagem das AgNORs se mostrou eficiente na distinção entre lesões benignas e malignas, bem como foi correlacionado com o grau de malignidade destes tumores (Bryan et al., 1990; Löhr et al., 1997; Serakides et al., 1999; Korneyev et al., 2000; Rivero & Aguiar, 2002; Barwijuk-Machata et al., 2004; Dzimira et al., 2005). Outros autores discordam, relatando que esta contagem não teria significado prognóstico, como visto no estudo de tumores do estroma do estômago e intestino delgado (Beer et al., 1992) e no mieloma múltiplo em humanos (Papadimitriou et al., 2000), bem como no schwannoma canino e neurofibroma canino e bovino (Viott, 2006).

Ao aplicar esta técnica a 49 tumores mamários caninos, obteve-se uma média de 2,23 (DP \pm 0,38) AgNORs/núcleo, com uma amplitude de 1,39 a 3,2. Já foi constatado que, as proteínas AgNOR tendem a estar em maior número em células neoplásicas, indicando que uma maior velocidade de proliferação celular corresponderia a uma maior quantidade de proteínas AgNOR (Sfacteria et al., 2003).

Resultados semelhantes aos destes estudos foram também encontrados em mastocitomas caninos, sendo que os valores médios de AgNORs/núcleo variaram de 2,2 em tumores que não recidivaram, e de 2,3 em tumores que não apresentaram metástases. Porém os mastocitomas que apresentaram

comportamento mais agressivo, com recidiva e metástase possuíam valores médios de AgNORs/núcleo superiores de 2,9 (Simões et al., 1994). Média semelhante a esta também foi encontrada em um estudo com linfomas caninos que expressaram médias de 2,9 AgNORs/núcleo (Valdovich et al., 2004). Já em um estudo realizado com o linfoma não-Hodgkin em humanos, os valores médios de AgNORs/núcleo variaram de 1,04 para o tecido linfóide normal, 1,66 para linfomas de baixo grau histológico, 2,52 para linfomas de grau histológico moderado e de 5,19 para linfomas de alto grau histológico (Yazdi & Taghavi, 2005). Resultados similares também foram encontrados por Rech et al. (2004), ao estudarem 45 mastocitomas caninos, que apresentaram média de 1,9 AgNORs/núcleo. Sendo que os mastocitomas classificados com grau I, II e III apresentaram, respectivamente, médias de 1,5, 1,85 e 3,25 AgNORs/núcleo. Estes dados levam a crer que, a variação dos valores médios de AgNORs/núcleo só devem ser comparados respeitando-se cada tipo tumoral, como também seus subtipos e variantes, por estes apresentarem comportamentos proliferativos distintos.

Em medicina veterinária existe uma classificação para tumores de mama em caninos que se baseia na descrição morfológica. Esta tem sido empregada em vários estudos investigativos clínicos, objetivando o prognóstico mais acurado (Misdorp, 2002). Quando avaliamos a distribuição das AgNORs, frente a esta classificação morfológica, pode-se evidenciar que os adenomas complexos expressaram valores médios de 1,95 (amplitude 1,39 – 2,26; DP \pm 0,39) AgNORs/núcleo. Já os carcinomas simples apresentaram valores de AgNORs/núcleo superiores (média 2,35; amplitude 1,72 – 3,2; DP \pm 0,38), aos carcinomas complexos (média 1,97; amplitude 1,84 – 2,35; DP \pm 0,16). Estes dados quando comparados foram estatisticamente significativos ($P < 0,0028$), sendo que os carcinomas simples e complexos diferiram entre si, porém ambos não foram estatisticamente diferentes dos adenomas complexos. Sabe-se que existem diferenças prognósticas entre estes dois tipos histológicos de carcinomas (Benjamin et al., 1999; Misdorp, 2002; Monteiro et al., 2005), pois os do tipo simples possuem um prognóstico reservado, quando comparados com os carcinomas complexos (Yamagami et al., 1996b; Misdorp, 2002).

Löhr et al. (1997), ao aplicarem esta técnica em tumores mamários caninos, encontraram valores inferiores aos encontrados no presente relato. Para os adenomas complexos o valor médio foi de 1,37 AgNORs/núcleo, e para os carcinomas complexos 1,42. Houve assim, diferença significativa entre tumores benignos e malignos, embora isto não tenha se mostrado como um valor preditivo para o prognóstico do tumor mamário canino. Isto foi concluído através de uma análise de dados exploratórios, realizada com base na avaliação da porção de crescimento obtida pelo Ki-67 e PCNA, através de imunohistoquímica, e pelo método de AgNOR. Estes dados não revelaram forte impacto para o procedimento diagnóstico e predição do prognóstico nestes tumores.

Quando somente os carcinomas simples foram avaliados, levando em consideração seus subtipos histológicos, observou-se que os carcinomas tubulopapilares revelaram uma média de 2,19 AgNORs/núcleo (amplitude 1,72 – 3,2; DP \pm 0,41). Já os carcinomas sólidos apresentaram uma média de 2,44 (amplitude 1,96 – 2,86; DP \pm 0,27), e os carcinomas anaplásicos foram os tumores simples de maior contagem de AgNORs/núcleo, com média de 2,51 (amplitude 1,92 – 3,11; DP \pm 0,24). Ao analisar os subtipos de carcinomas simples e o carcinoma complexo observou-se que estes eram estatisticamente significativos ($P < 0,0001$), sendo que o carcinoma complexo diferiu dos subtipos sólido e anaplásico, mas não do subtipo tubulopapilar. Já o subtipo tubulopapilar diferiu somente do subtipo anaplásico e não do subtipo sólido e do carcinoma complexo. Os tumores sólidos diferiram dos carcinomas complexos, mas não dos subtipos tubulopapilar e anaplásico. Já o carcinoma anaplásico diferiu do subtipo tubulopapilar e do carcinoma complexo, mas não do subtipo sólido. Estes resultados reforçam a diferença prognóstica existente entre estes três subtipos de carcinomas simples, já citada por outros autores, sendo que os do subtipo sólido e anaplásico apresentam um pobre prognóstico (Benjamin et al., 1999; Misdorp, 2002). Isto é ainda reforçado através dos altos valores de AgNORs encontrados nestes dois subtipos, quando comparados com os valores encontrados nos tipo complexo e subtipo tubulopapilar.

Quando Löhr et al. (1997), estudaram os subtipos histológicos de carcinomas simples, encontraram valores médios de AgNORs/núcleo inferiores

aos do presente relato. Isto ocorreu tanto nos carcinomas tubulopapilar, que expressaram a menor média (1,37 AgNORs/núcleo), quanto nos carcinomas sólido (1,67 AgNORs/núcleo) e anaplásico (2,05 AgNORs/núcleo), que foi o tumor com maior média deste estudo.

Ao analisar a distribuição da contagem de AgNORs/núcleo, considerando o sistema de graduação histológica proposta por Elston & Ellis (1991), percebeu-se que o aumento do grau de malignidade era acompanhado pelo crescente aumento do valor médio das AgNORs. Sendo assim, os tumores classificados como grau I apresentaram uma média de 1,99 AgNORs/núcleo (amplitude 1,73 – 2,7; DP \pm 0,27). Já os classificados como grau II, revelaram uma média de 2,25 (amplitude 1,72 – 3,2; DP \pm 0,39), e os classificados como grau III uma maior média de 2,51 (amplitude 1,92 – 3,11; DP \pm 0,27). A análise estatística destes dados também se mostrou estatisticamente significativa ($P < 0,0003$), sendo que os carcinomas grau I e III diferiram entre si, mas não dos de grau II.

A avaliação da quantidade de AgNOR nos núcleos das células é uma ferramenta única para obter informações da velocidade de biogênese ribossomal em preparações citohistopatológicas (Pich et al., 2004; Trerè et al., 2004). Dzimira et al. (2005), em seu trabalho concluíram que, a coloração com prata das NORs é um método simples e barato, defendendo estimativas da velocidade de proliferação celular e que o método confirma baixa ou alta malignidade em exames histopatológicos da rotina para tumores.

No presente relato observou-se que o aumento dos valores médios de AgNORs/núcleo era acompanhado pelo aumento da malignidade de cada tipo histológico. Isto pode ser evidenciado no adenoma complexo (média 1,95) quando comparado com o carcinoma simples sólido (média 2,44) e anaplásico (média 2,51). O mesmo foi observado na graduação histológica dos carcinomas mamários, pois os tumores classificados com grau I possuíam médias inferiores (1,99), comparados com os carcinomas grau III (2,51). Isto revela que, os valores médios de AgNORs/núcleo tendem a ser superiores em tumores que apresentam características histológicas de malignidade.

Porém ao analisar estes dados observa-se aqui a necessidade da realização de estudos prospectivos de avaliação da sobrevida dos pacientes,

contrapondo-os com os dados obtidos através da avaliação da morfologia descritiva, graduação histológica e média de AgNORs/núcleo dos neoplasmas mamários, com o objetivo de evidenciar o seu real valor prognóstico na rotina veterinária.

4.6. Conclusões

Com os dados apresentados neste estudo pode-se concluir que a média de AgNOR/núcleo tende a elevar-se em tumores que apresentem características histológicas de malignidade. Isto é melhor observado no carcinoma simples, subtipo anaplásico, e nos tumores classificados histologicamente como grau III.

4.7. Referências

- BARWIJUK-MACHATA, M.; MUSIATOWICZ, B.; CYIWIK, J.; RESZEĆ, J.; AUGUSTYNOWICZ, A. AgNOR, Ki-67 and PCNA expression in fibroepithelial tumours of the breast in correlation with morphological features. *Folia Morphol* v. 63, p.133 – 135, 2004.
- BEER, T. W.; ROWLANDS, D. C.; CROCKER, J. AgNOR counts and determination of malignancy in stromal tumours of the stomach and small intestine. *J Clin Pathol* v. 45, p.172 – 174, 1992.
- BENJAMIN, S. A.; LEE, A. C.; SAUNDERS, W. J. Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles. *Veterinary Pathology* v. 36, p.423-436, 1999.
- BRYAN, R. L.; CROCKER J.; FARR A. Nucleolar organizer regions in kidney tumours and xanthogranulomatous pyelonephritis. *J Clin Pathol* v. 43, p.147– 148, 1990.
- CECCARELLI, C.; TRERÈ, D.; SANTINI, D.; TAFFURELLI, M.; CHIECO, P.; DERENZINI, M. AgNORS in breast tumours. *Micron*, v. 31, p.143 - 149, 2000.
- CROCKER, J. & SKILBECK, N. Nucleolar organiser region associated proteins in cutaneous melanotic lesions: a quantitative study. *J Clin Pathol* v. 40, p.885 – 889, 1987.
- CROCKER, J. BOLD, D. A., EGAN M. J. How should we count AgNORS? Proposals for a standardized approach. *J Pathol* v. 158, p.185 – 188, 1989.
- CROCKER, J. Lymphoid aggregates in bone marrow trephine: new approach to a continuing problem. *J Pathol* v. 178, p.367 – 368, 1996.
- DERENZINI, M.; TRERÈ, D.; OLIVERI, F.; DAVID, E.; COLOMBANO, P.; BONINO, F.; BRUNETTO, M. R. Is high AgNOR quantity in hepatocytes associated with increase risk of hepatocellular carcinoma in chronic liver disease? *J Clin Pathol* v. 46, p.727 – 729, 1993.

- DERENZINI, M. The AgNORs *Micron* v. 31, p.117 – 120, 2000.
- DERENZINI, M., CECCARELLI, C., SANTINI, D., TAFFURRELLI, TRERÈ, D. The prognostic value of the AgNOR parameter in human breast cancer depends on the prb and p53 status. *J Clin Pathol* v. 57, p.755 – 761, 2004.
- DZIMIRA, S.; MADEJ, J. A.; NOMAK, M. studies on nucleolar organiser regions (AgNORs) in selected spontaneous and transplantable animal tumors. *Plo J Vet Sci* v. 8, p.127 – 135, 2005.
- ELSTON, C. W. & ELLIS, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* v. 19, p.403 – 410, 1991.
- HARVEY, J. M.; KLERK, N. H.; ROBBINS, P. D.; STERRETT, G. F. Histological grading of breast cancer: a study of reproducibility of consensus grading. *The Breast* v. 4, p.297 – 300, 1995.
- HELLMÉN, E.; BERGSTRÖM, R.; HOLMBERG, L.; SPANGBERG, I. B.; HANSSON, K.; LINDGREN, A. Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. *Veterinary Pathology* v. 30, p.20 – 27, 1993.
- Instituto de Patologia das Forças Armadas Americanas. Disponível em : <www.afip.org/vetpath/who/whomamm.htm> Acesso em 22 de maio de 2005.
- KARAYANNOPOULOU, M.; KALDRYMIDOU, E.; CONSTANTINIDIS, T. C.; DESSIRIS, A. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. *J Comp Path* v. 133, p.246 – 252, 2005.
- KORNEYEV, I. A.; MAMAEV, N. N.; KOZLOV, V. V.; RYBAKOVA, M. G.; AL-SHUKRI, S. H. Interphase argyrophilic nucleolar regions and nucleolar counts in transitional cell bladder tumours. *J Clin Pathol: Mol Pathol* v. 53, p. 129 – 132, 2000.
- KRAVIS, L. D.; VAIL, D. M.; KISSEBERTH, W. C.; OGILVIE, G. K.; VOLK, L. M. Frequency of argyrophilic nucleolar organizer regions in fine-needle aspirates and biopsy specimens from mast cell tumors in dogs. *JAVMA* v. 209, p.1418 – 1420, 1996.
- KUWANO, H.; SUMIYOSHI, K.; NOZOE, T.; YASUDA, M.; WATANABE, M.; SUGIMACHI, K. The prognostic significance of the cytophotometric dna content and its relationship with the argyrophilic nucleolar regions (AgNOR) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in oesophageal cancer. *European Journal of Surgical Oncology* v. 21, p.368 – 373, 1995.
- LORENZATO, M.; ABOUD, P.; LECHKI, C.; BROWARNYJ, F.; O'DONOHUE, M. F.; PLOTON, D.; ADNET, J. J. Proliferation assessment in breast cancer: a double-staining technique for AgNOR quantification in MIB1 positive cells especially adapted for image cytometry. *Micron* v. 31, p.151 – 159, 2000.
- LÖHR, C. V.; TEIFKE, J. P.; FAILING, K.; WEISS, E. Characterization of the proliferation state in canine mammary tumors by the standardizer AgNOR method with postfixation and imunohistohistologic detection of Ki-67 and PCNA. *Veterinary Pathology* v. 34, p.212 – 221, 1997.

- MISDORP, W. Tumors of the Mammary Gland. In: MEUTEN, D. J. Tumors in Domestic Animals. Iowa: Editora Iowa State Press, 4^o ed., 2002, p. 575-606.
- MONTEIROS, A. E. de los; MILLÁN, M. Y.; RAMÍREZ, G. A.; ORDÁS, J.; REYMUNDO, C.; MULAS, J. M. de las. Expression of maspin in mammary gland tumors of the dog. *Veterinary Pathology* v. 42, p.205 – 207, 2005.
- OSHIMA, C. T. F. & FORONES, N. M. AgNOR em câncer gástrico. *Arq Gastroenterol* v. 38, p.89 - 93, 2001.
- PAPADHIMITRIOU, S. I.; DASKALOPOULOU, D.; TSAFTARISDIS, P.; MARKIDOU, S.; STAMATELOU, M. Evaluation of argyrophilic nucleolar organiser regions (AgNORs) in multiple myeloma. *J Clin Pathol* v. 53, p.462 – 465, 2000.
- PÉREZ ALENZA, M. D.; PEÑA, L.; NIETO, A. I; CASTEÑO, M. Clinical and pathological prognostic factors in canine mammary tumours. *Ann Ist Super Sanità* v. 33, p.581 – 585, 1997.
- PICH, A.; CHIUSA, L.; MARGARIA, E. Prognostic relevance of AgNORs in tumor pathology. *Micron*, v. 31, p.133 – 141, 2000.
- PICH, A.; CHIUSA, L.; NAVONE, R. Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumors. *Annals of Oncology* v. 15, p.1319 – 1329, 2004.
- PIFFKO, J.; BANKFALVI, A.; OFNER, D.; RASCH, D.; JOOS, U.; SCHMID, K. W. Standardized AgNOR analysis of the invasive tumour front in oral squamous cell carcinomas *J Pathol* v. 182, p 450 – 456, 1997.
- PIRES, M. A.; TRAVASSOS, F. S.; PIRES, I. Neoplasias em canídeos – Um estudo descritivo de 6 anos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* v. 98, p.111 – 118, 2003.
- PLOTON, D.; MENAGER, M.; JEANNESSON, P.; HIMBER, G.; PIGEON, F.; ADNET, J. J. Improvement in the staining and the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J* v. 18, p.5 – 14, 1986.
- RECH, R. R.; GRAÇA, D. L.; KOMMERS, G. D.; SALLIS, E. S. V.; RAFFI, M. B.; GARMATZ, S. L. Mastocitomas cutâneos caninos: Estudo de 45 casos. *Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.* v. 56, p.441 – 448, 2004.
- RIVERO, E. R. C. & AGUIAR, M. C. F. Análise quantitativa das AgNORs no carcinoma adenóide cístico intra-oral através da técnica de dupla marcação PCNA/AgNOR. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* v. 38, p.39 – 44, 2002.
- SERAKIDES, R.; NUNES, V. A.; SANTOS, R. L.; CASSALI, G. D.; COSTA NETO, P. P. Histomorphometry and quantification of nucleolar organizer regions in bovine thyroid containing methylthiouracil residues. *Veterinary Pathology* v. 36, p.574 – 582, 1999.
- SFACTERIA, A.; BERTANI, C.; COSTANTINO, G.; DEL BLUE, M.; PAIARDINIT, M.; CERVASI, B.; PIEDIMONTE, A.; DE VICO, G. Cyclin D1 expression in pre-cancerous and cancerous lesions of the canine mammary gland. *J Comp Path* v. 128, p.245 – 251, 2003.

- SIMÕES, J. P. C.; SCHONING, P.; BUTINE, M. Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods. *Veterinary Pathology* v. 31, p.637–647, 1994.
- TATEISHI, M.; KANEKO, S.; FUKUYAMA, Y.; HAMATAKE, M.; KOHDONO, S.; MITSUDOMI, T.; ISHIDA, T.; SUGIMACHI, K. The close relationship between growth factors and the nucleolar organizer regions in adenocarcinoma of the lung. *European Journal of Surgical Oncology* v. 21, p.398 – 402, 1995.
- TRERÈ, D. AgNOR Staining and quantification. *Micron* v. 31, p.127 – 131, 2000.
- THERÈ, D.; CECCARELLI, C.; MONTANARO, L.; TOSTI, E.; DERENZINI, M. Nucleolar size and activity are related to pRb status in human breast cancer. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* v. 52, p.1601 – 1607, 2004.
- VALDOVICH, P.; PSÁDER, R.; TÓTIL, Z. A.; PERGE, E. Use of the argyrophilic nucleolar region method for cytologic and histologic examination of the lymph nodes in dogs. *Veterinary Pathology* v. 41, p.338 – 345, 2004.
- VAN DIEST, P. J.; VAN DER WALL, E.; BAAK, J. P. A. Prognostic value of proliferation in invasive breast cancer: a review. *J Clin Pathol* v. 57, p.675 – 681, 2004.
- VIOTT, A. M., Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. Santa Maria, 2006. 128f. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.
- YAMAGAMI, T.; KOBAYASHI, T.; TAKAHASHI, K.; SUGIVAMA, M. Prognosis for malignant mammary tumors based on tnm and histologic classification *J Vet Med Sci* v. 58, p.1079 - 1083, 1996.
- YAZDI, I. & TAGHAVI, N. The assessment of AgNORs in grading of head and neck non-Hodgkin's lymphoma. *Arch Iranian Med* v. 8, p.282 – 285, 2005.

5. Conclusões

Com os dados deste estudo conclui-se que, os dois sistemas de classificação histológica se complementam, sendo importante sua comparação. Porém a realização isolada da graduação histológica forneceu maiores informações sobre o possível comportamento biológico destes neoplasmas. E que a média de AgNORs/núcleo tende a elevar-se em tumores que apresentem características histológicas de malignidade. Isto melhor observado nos carcinomas simples, subtipo anaplásico, e nos tumores classificados histologicamente como de grau III.

6. Referências

- AKIYOSHI, T.; UCHILDA, K.; TATEYAMA, S. Expression of bone morphogenetic protein-6 and bone morphogenetic protein receptors in myoepithelial cells of canine mammary gland tumors. **Veterinary Pathology** v. 41, p.154 - 163, 2004.
- BARWIJUK-MACHATA, M.; MUSIATOWICZ, B.; CYIWIK, J.; RESZEĆ, J.; AUGUSTYNOWICZ, A. AgNOR, Ki-67 and PCNA expression in fibroepithelial tumours of the breast in correlation with morphological features. **Folia Morphol** v. 63, p.133 – 135, 2004.
- BEER, T. W.; ROWLANDS, D. C.; CROCKER, J. AgNOR counts and determination of malignancy in stromal tumours of the stomach and small intestine. **J Clin Pathol** v. 45, p.172 – 174, 1992.
- BENJAMIN, S. A.; LEE, A. C.; SAUNDERS, W. J. Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles. **Veterinary Pathology**, v. 36, p.423-436, 1999.
- BRYAN, R. L.; CROCKER J.; FARR A. Nucleolar organizer regions in kidney tumours and xanthogranulomatous pyelonephritis. **J Clin Pathol** v. 43, p.147 – 148, 1990.
- BRYNE, M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? **Oral Dis** v. 4, p.70 – 77, 1998.
- CASSALI, G. D., **Estudo morfológico, imuno-histoquímico e citométrico de tumores mamários da cadela – Aspectos comparativos com neoplasias da mama humana**. Belo Horizonte, 2000. 80f. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.
- CECCARELLI, C.; TRERÈ, D.; SANTINI, D.; TAFFURELLI, M.; CHIECO, P.; DERENZINI, M. AgNORS in breast tumours. **Micron**, v. 31, p.143 - 149, 2000.
- CROCKER, J. & SKILBECK, N. Nucleolar organiser region associated proteins in cutaneous melanotic lesions: a quantitative study. **J Clin Pathol** v. 40, p.885 – 889, 1987.
- CROCKER, J. BOLD, D. A., EGAN M. J. How should we count AgNORS? Proposals for a standardized approach. **J Pathol** v. 158, p.185 – 188, 1989.

- CROCKER, J. Lymphoid aggregates in bone marrow trephine: new approach to a continuing problem. **J Pathol** v. 178, p.367 – 368, 1996.
- DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; SOUSA, R. S.; COSTA, T. A.; MACEDO, T. R.; RODIGHIERI, S. M.; RIOS, A.; PIEKARZ, C. H. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal do Paraná. **Archives of Veterinary Science** v. 7, p.15 – 26, 2002.
- DUTRA, A. P.; GRANJA, N. V. M.; SCHMITT, F. C.; CASSALI, G. D. c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. **Braz J Med Biol Res** v. 37, p.1673 – 1681, 2004.
- DERENZINI, M.; TRERÈ, D.; OLIVERI, F.; DAVID, E.; COLOMBANO, P.; BONINO, F.; BRUNETTO, M. R. Is high AgNOR quantity in hepatocytes associated with increase risk of hepatocellular carcinoma in chronic liver disease? **J Clin Pathol** v. 46, p.727 – 729, 1993.
- DERENZINI, M. The AgNORs **Micron** v. 31, p.117 – 120, 2000.
- DERENZINI, M., CECCARELLI, C., SANTINI, D., TAFFURRELLI, TRERÈ, D. The prognostic value of the AgNOR parameter in human breast cancer depends on the prb and p53 status. **J Clin Pathol** v. 57, p.755 – 761, 2004.
- DZIMIRA, S.; MADEJ, J. A.; NOMAK, M. studies on nucleolar organiser regions (AgNORs) in selected spontaneous and transplantable animal tumors. **Plo J Vet Sci** v. 8, p.127 – 135, 2005.
- ELSTON, C. W. & ELLIS, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology** v. 19, p.403 – 410, 1991.
- FERREIRA, E.; BREGUNCI, G. C., SCHMITT, F.C., CASSALI, G. D. Protocol for the anatomopathological examination of canine mammary tumors. **Arq Bras Med Vet Zootec** v. 55, p.105 – 109, 2003.
- GAMA, A.; ALVES, A.; GARTNER, F.; SCHMIT, F. p63: A novel myoepithelial marker in canine mammary tissues. **Veterinary Pathology** v. 40, p.412 - 420, 2003.
- HARVEY, J. M.; KLERK, N. H.; ROBBINS, P. D.; STERRETT, G. F. Histological grading of breast cancer: a study of reproducibility of consensus grading. **The Breast** v. 4, p.297 – 300, 1995.
- HELLMÉN, E.; BERGSTRÖM, R.; HOLMBERG, L.; SPANGBERG, I. B.; HANSSON, K.; LINDGREN, A. Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. **Veterinary Pathology** v. 30, p.20 – 27, 1993.
- HELLMÉN, E.; MOLLER, M.; BLANKENSTEIN, M. A.; ANDERSSON, L.; WESTERMARK, B. Expression of different phenotypes in cell lines from canine mammary spindle-cell tumours and osteosarcomas indicating a pluripotent mammary stem cell origin. **Breast Cancer Research and Treatment** v. 61, p.197 - 210, 2000.
- Instituto de Patologia das Forças Armadas Americanas. Disponível em : www.afip.org/vetpath/who/whomamm.htm Acesso em 22 de maio de 2005.

- KARAYANNOPOULOU, M.; KALDRYMIDOU, E.; CONSTANTINIDIS, T. C.; DESSIRIS, A. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. **J Comp Path** v. 133, p.246 – 252, 2005.
- KORNEYEV, I. A.; MAMAEV, N. N.; KOZLOV, V. V.; RYBAKOVA, M. G.; AL-SHUKRI, S. H. Interphase argyrophilic nucleolar regions and nucleolar counts in transitional cell bladder tumours. **J Clin Pathol: Mol Pathol** v. 53, p.129 – 132, 2000.
- KRAVIS, L. D.; VAIL, D. M.; KISSEBERTH, W. C.; OGILVIE, G. K.; VOLK, L. M. Frequency of argyrophilic nucleolar organizer regions in fine-needle aspirates and biopsy specimens from mast cell tumors in dogs. **JAVMA** v. 209, p.1418 – 1420, 1996.
- KUWANO, H.; SUMIYOSHI, K.; NOZOE, T.; YASUDA, M.; WATANABE, M.; SUGIMACHI, K. The prognostic significance of the cytophotometric dna content and its relationship with the argyrophilic nucleolar regions (AgNOR) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in oesophageal cancer. **European Journal of Surgical Oncology** v. 21, p.368 – 373, 1995.
- LOAR, A. S.: Tumores do Sistema Genital e Glândulas Mamárias In: **ETTINGER, S. J.** Tratado de Medicina Interna Veterinária. São Paulo: Editora Manole Ltda, 3ª ed., 1992, p.1900 - 1906.
- LORENZATO, M.; ABOUD, P.; LECHKI, C.; BROWARNYJ, F.; O'DONOHUE, M. F.; PLOTON, D.; ADNET, J. J. Proliferation assessment in breast cancer: a double-staining technique for AgNOR quantification in MIB1 positive cells especially adapted for image cytometry. **Micron** v. 31, p.151 – 159, 2000.
- LÖHR, C. V.; TEIFKE, J. P.; FAILING, K.; WEISS, E. Characterization of the proliferation state in canine mammary tumors by the standardizer AgNOR method with postfixation and imunohistohistologic detection of Ki-67 and PCNA. **Veterinary Pathology** v. 34, p.212 – 221, 1997.
- MARTINS, A.M.C.R.P.F., TAMASO, E., GUERRA, J.L. Retrospective review and systematic study of mammary tumors in dogs and characteristics of the extracellular matrix. **Braz J Vet Res Anim Sci** vol. 39, São Paulo, 2002.
- MELLO, E. S. & ALVES, V. A. F. Marcadores de Proliferação Celular In: **ALVES, V. A. F.; BACCHI, C. E.; VASSALO, J.** Manual de Imuno-histoquímica Editora Sociedade Brasileira de Patologia São Paulo 1999, p.182 - 194.
- MISDORP, W. & HART, A. A. M. Canine mammary cancer I. Prognosis **J Small Anim Pract** v. 20, p.385 – 394, 1979.
- MISDORP, W.; ELSE, R.W.; HELLMÉN, E. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. World Health Organization. Washington, D.C., v.7, p.59, 1999.
- MISDORP, W. Tumors of the Mammary Gland. In: **MEUTEN, D. J.** Tumors in Domestic Animals. Iowa: Editora Iowa State Press, 4ª ed., 2002, p.575 - 606.
- MONTEIROS, A. E. de los; MILLÁN, M. Y.; ORDÁS, J.; CARRASCO, L.; REYMUNDO, C.; MULAS, J. M. de las. Immunolocalization of the smooth

- muscle-specific protein calponin in complex and mixed tumors of the mammary gland of the dog: assessment of the morphogenetic role of the myoepithelium. **Veterinary Pathology** v. 39, p.247 – 256, 2002.
- MONTEIROS, A. E. de los; MILLÁN, M. Y.; RAMÍREZ, G. A.; ORDÁS, J.; REYMUNDO, C.; MULAS, J. M. de las. Expression of maspin in mammary gland tumors of the dog. **Veterinary Pathology** v. 42, p.205 – 207, 2005.
- MOULTON, J. E. Tumors of the mammary gland. In: **MOULTON, J.E.** Tumors in domestic animals. Berkley: University of California, 3^a ed., 1990, p.518 - 552.
- MONLUX, A. W.; ROSZEL, J. F.; MACVEAN, D. W.; PALMER, T. W. Classification of epithelial canine mammary tumors in a defined population. **Veterinary Pathology** v. 14, p.194 – 217, 1977.
- MOURAD, W. A.; ERKMAN-BALIS, B.; LIVINGSTON, S.; SHOUKRI, M.; COX, C. E.; NICOSIA, S. V.; ROWLANDS, D. T. Jr. Argyrophilic nucleolar organizer regions in breast carcinoma. Correlation with DNA flow cytometry, histopathology, and lymph node status. **Cancer** v. 69, p.1739 – 1744, 1992.
- MULAS, J. M. de Las; MILLÁN, Y.; DIOS, R. A Prospective analisis of immunohistochemically determined estrogen receptor α and progesterone receptor expression and host and tumor factor as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. **Veterinary Pathology** v. 42, p.200-212, 2005.
- MUNAKATA, S. & HENDRICKS, J. B. A Multilabeling technique for simultaneous demonstration and quantitation of Ki-67 and nucleolar organizer regions (AgNORs) in paraffin-embedded tissue. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry** v. 42, p.789 – 93, 1994.
- OKAMURA, Y.; HARAGUCHI, T.; MORIMOTO, M.; OKURA, M.; UNE, S.; NAKAICHI, M.; TAURA, Y. Expression of a tumor-associated antigen, RCAS1, in canine mammary tumors. **J. Vet. Med. Sci.** v. 66, p.651 - 658, 2004.
- O'KEEFE, D. A. Sistema reproductivo. In: **ETTINGER, S. J. & FELDMAN, E. C.** Tratado de Medicina Interna Veterinária. São Paulo: Editora Manole LTDA, 4^a ed., 1997, p.2348 – 2351.
- OSHIMA, C. T. F. & FORONES, N. M. AgNOR em câncer gástrico. **Arq Gastroenterol** v. 38, p.89 - 93, 2001.
- PAPADHIMITRIOU, S. I.; DASKALOPOULOU, D.; TSAFTARISDIS, P.; MARKIDOU, S.; STAMATELOU, M. Evaluation of argyrophilic nucleolar organiser regions (AgNORs) in multiple myeloma. **J Clin Pathol** v. 53, p.462– 465, 2000.
- PÉREZ ALENZA, M. D.; PEÑA, L.; NIETO, A. I; CASTEÑO, M. Clinical and pathological prognostic factors in canine mammary tumours. **Ann Ist Super Sanità** v. 33, p.581 – 585, 1997.
- PICH, A.; CHIUSA, L.; MARGARIA, E. Prognostic relevance of AgNORs in tumor pathology. **Micron**, v. 31, p.133 – 141, 2000.
- PICH, A.; CHIUSA, L.; NAVONE, R. Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumors. **Annals of Oncology** v. 15, p.1319 – 1329, 2004.

- PIFFKO, J.; BANKFALVI, A.; OFNER, D.; BRYNE, M.; RASCH, D.; JOOS, U.; BROCKER, W.; SCHMID, K. W. Prognostic value of histobiological factors (malignancy grading and AgNOR conten) assessed at the invasive tumour front of oral squamous cell carcinomas. **Br J Cancer** v. 75, p.1543 – 1546, 1997 a.
- PIFFKO, J.; BANKFALVI, A.; OFNER, D.; RASCH, D.; JOOS, U.; SCHMID, K. W. Standardized AgNOR analysis of the invasive tumour front in oral squamous cell carcinomas **J Pathol** v. 182, p.450 – 456, 1997 b.
- PINDER, S. E.; ELLIS, I. O. ; LESTÓN, C. W. Prognostic factors in primary breast carcinoma. **J Clin Pathol** v. 48, p.981 – 983, 1995.
- PIRES, M. A.; TRAVASSOS, F. S.; PIRES, I. Neoplasias em canídeos – Um estudo descritivo de 6 anos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias** v. 98, p.111 – 118, 2003.
- PLOTON, D.; MENAGER, M.; JEANNESSON, P.; HIMBER, G.; PIGEON, F.; ADNET, J. J. Improvement in the staining and the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. **Histochem J** v. 18, p.5 – 14, 1986.
- QUEIROGA, F. & LOPES, C. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos factores de prognóstico. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias** v. 97, p.119 – 27, 2002.
- RECH, R. R.; GRAÇA, D. L.; KOMMERS, G. D.; SALLIS, E. S. V.; RAFFI, M. B.; GARMATZ, S. L. Mastocitomas cutâneos caninos: Estudo de 45 casos. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.** v. 56, p.441 – 448, 2004.
- RIVERO, E. R. C. & AGUIAR, M. C. F. Análise quantitativa das AgNORs no carcinoma adenóide cístico intra-oral através da técnica de dupla marcação PCNA/AgNOR. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial** v. 38, p.39 – 44, 2002.
- SCHMITT, F. C. Marcadores prognósticos em carcinomas mamários. In: **ALVES, V. A. F.; BACCHI, C. E.; VASSALO, J.** Manual de Imuno-histoquímica Editora Sociedade Brasileira de Patologia São Paulo, 1999, p.30 –46.
- SERAKIDES, R.; NUNES, V. A.; SANTOS, R. L.; CASSALI, G. D.; COSTA NETO, P. P. Histomorphometry and quantification of nucleolar organizer regions in bovine thyroid containing methylthiouracil residues. **Veterinary Pathology** v. 36, p.574 – 582, 1999.
- SFACTERIA, A.; BERTANI, C.; COSTANTINO, G.; DEL BLUE, M.; PAIARDINIT, M.; CERVASI, B.; PIEDIMONTE, A.; DE VICO, G. Cyclin D1 expression in pre-cancerous and cancerous lesions of the canine mammary gland. **J Comp Path** v. 128, p.245 – 251, 2003.
- SIMÕES, J. P. C.; SCHONING, P.; BUTINE, M. Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods. **Veterinary Pathology** v. 31, p.637– 647, 1994.
- SIMON, D.; KNEBEL, J. W.; BAUMGÄRTNER, W.; AUFDERHEIDE, M.; MEYER-LINDENBERG, A.; NOLTE, I. In vitro efficacy of chemotherapeutics as determined by 50% inhibitory concentrations in cell cultures of mammary

- gland tumors obtained from dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, p.1825-1830, 2001.
- TATEISHI, M.; KANEKO, S.; FUKUYAMA, Y.; HAMATAKE, M.; KOHDONO, S.; MITSUDOMI, T.; ISHIDA, T.; SUGIMACHI, K. The close relationship between growth factors and the nucleolar organizer regions in adenocarcinoma of the lung. **European Journal of Surgical Oncology** v. 21, p.398 – 402, 1995.
- TRERÈ, D. AgNOR Staining and quantification. **Micron** v. 31, p.127 – 131, 2000.
- THERÈ, D.; CECCARELLI, C.; MONTANARO, L.; TOSTI, E.; DERENZINI, M. Nucleolar size and activity are related to pRb status in human breast cancer. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry** v. 52, p.1601 – 1607, 2004.
- VALDOVICH, P.; PSÁDER, R.; TÓTIL, Z. A.; PERGE, E. Use of the argyrophilic nucleolar region method for cytologic and histologic examination of the lymph nodes in dogs. **Veterinary Pathology** v. 41, p.338 – 345, 2004.
- VAN DIEST, P. J.; BRUGAL, G.; BAAK, J. P. A. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. **J Clin Pathol** v. 51, p.716 – 724, 1998.
- VAN DIEST, P. J.; VAN DER WALL, E.; BAAK, J. P. A. Prognostic value of proliferation in invasive breast cancer: a review. **J Clin Pathol** v. 57, p.675 – 681, 2004.
- VIOTT, A. M., **Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas**. Santa Maria, 2006. 128f. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.
- YAMAGAMI, T.; KOBAYASHI, T.; TAKAHASHI, K.; SUGIVAMA, M. Influence of ovariectomy at the time of mastectomy on the prognosis for canine malignant mammary tumours. **British Small Animal Veterinary Association** v. 37, p.462 – 464, 1996 a.
- YAMAGAMI, T.; KOBAYASHI, T.; TAKAHASHI, K.; SUGIVAMA, M. Prognosis for Malignant Mammary Tumors Based on TNM and Histologic Classification **J Vet Med Sci**. v. 58, p.1079 - 1083, 1996 b.
- YAZAWA, M.; OKUDA, M.; SETOBUCHI, A.; IWABUCHI, S.; NISHIMURA, R.; SASAKI, N.; MASUDA, K.; OHNO, K.; TSUJIMOTO, H.; Telomere length and telomerase activity in canine mammary gland tumors. **A J V R** v. 62, p.1539 – 1543, 2001.
- YAZDI, I. & TAGHAVI, N. The assessment of AgNORs in grandihg of head and neck non-Hodgkin's lymphoma. **Arch Iranian Med** v. 8, p.282 – 285, 2005.

Apêndice

Método de AgNOR

Soluções:

Nitrato de prata 50%

Nitrato de prata....50 g

Água deionizada..100 ml

Solução de gelatina

Gelatina.....2 g

Ácido fórmico.....1 ml

Água deionizada.....100 ml

Misturar primeiro o ácido fórmico e após a gelatina.

Solução de trabalho

Nitrato de prata.....8 ml (2 partes)

Solução de gelatina..4 ml (1 parte)

usar 12 ml de Nitrato de Prata e 6 ml de gelatina.

Misture a solução acima imediatamente antes do uso. O volume da solução de trabalho usada depende do número de lâminas a serem coradas. Este volume é adequado para corar aproximadamente 5 lâminas (em caixinha plástica para guardar lâminas).

Amarelo da Metanila

Amarelo de metanila.....1 g

Água desidratada.....100 ml

Ácido acético.....0,25 ml

Procedimento

Tempo: 1 hora.

Desparafine (20 minutos em xilol na estufa á 60°C) e hidrate as lâminas em água deionizada (somente para biópsias)

Neste ponto começa o procedimento para esfregaços

Coloque as lâminas na solução de trabalho em uma caixinha plástica por 45 minutos em estufa a 37°C.

Lave as lâminas em água deionizada por 1 minuto

Opcional: contracorar com amarelo de metanila por 3 minutos (lavar com água deionizada)

Desidrate (30 segundos em cada álcool), clarifique e monte a lâmina usando redina sintética.

Para esfregaços:

Deixe as lâminas em temperatura ambiente

Secar ao ar

Fixar em cetona por 10 minutos

Secar novamente

Começar no passo 3 da técnica acima.

Resultados

Locais AgNOR – pontos pretos intranucleares

Fundo – amarelo pálido