

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**

Programa de Pós Graduação em Veterinária



Dissertação

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO, CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA E FATORES  
PROGNÓSTICOS PELA TÉCNICA DE QUANTIFICAÇÃO DAS AgNORs EM  
TUMORES MAMÁRIOS FELINOS**

**MELISSA BORBA SPADER**

Pelotas, 2009

**MELISSA BORBA SPADER**

**ESTUDO EPIDEMIOLOGICO, CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA, E FATORES  
PROGNÓSTICOS PELA TÉCNICA DE QUANTIFICAÇÃO DAS AgNORs EM  
TUMORES MAMÁRIOS FELINOS**

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  
do conhecimento: Patologia Animal).

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristina Gevehr Fernandes

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Josiane Bonel Raposo

Pelotas, 2009

## **Dados de catalogação na fonte:**

Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744

S732e Spader, Melissa Borba

Estudo epidemiológico, classificação histológica, e fatores prognósticos pela técnica de quantificação das AgNORs em tumores mamários felinos / Melissa Borba Spader - Pelotas, 2009.

57f. : il.

Dissertação ( Mestrado em Patologia Animal ) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária Faculdade de Veterinária. Universidade Federal de Pelotas. - Pelotas, 2009, Cristina Gevehr Fernandes, Orientador; co-orientador Josiane Bonel Raposo.

**Banca examinadora:**

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Cristina Gevehr Fernandes – FV/DPA/UFPel – Orientadora

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Josiane Bonel Raposo – FV/DPA/UFPel – Co- Orientadora

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gilma Santos Trindade – ICB/ FURG

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia de Oliveira Nobre – FV/DCV/UFPel

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho aos meus pais, César Antonio Spader e Nilza Borba Spader, por seu amor, dedicação, apoio e por acreditarem no meu potencial. Amo vocês.

## **Agradecimentos**

A Deus que está presente em nossas vidas, nos momentos bons e nos mais difíceis a cada momento iluminando nossas mentes, compreendendo aos nossos anseios e nos dando a necessária coragem para atingirmos os nossos objetivos e me acolheu nos momentos mais difíceis desta caminhada.

Encerro aqui mais uma etapa da minha vida acadêmica e gostaria de agradecer a minha orientadora, Josiane por acreditar em mim, e no meu potencial em aprender patologia.

A professora Cristina Gevehr Fernandes pela sensibilidade, paciência e apoio na realização deste trabalho.

Ao meu marido, Deivith da Cunha, pelo apoio nos momentos difíceis e por compartilhar com amor as dificuldades e alegrias da minha conquista;

Aos meus pais, Cesar e Nilza Spader, pelo amor incondicional;

À minha irmã, Tatiana Spader, por acreditar nos meus sonhos e me apoiar nesta caminhada.

Aos professores, técnicos e funcionários do Departamento de Patologia Animal, pela dedicação profissional.

As minhas colegas do mestrado, Tice e Fabi que se tornaram minhas irmãs, e principalmente a Tati e Lili que são pessoas queridas insubstituíveis na minha vida. Ao Thomas e Matheus pelo companheirismo e parceria.

Aos estagiários e bolsistas do Departamento de Patologia Animal, sempre pacientes, alegres, dispostos e compreensivos, o meu muito obrigado.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## Resumo

SPADER, Melissa Borba, **Estudo epidemiológico, classificação histológica, e fatores prognósticos pela técnica de quantificação das AgNORs em tumores mamários felinos**. 2009, 57p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Com o objetivo de estudar os tumores mamários felinos e de buscar métodos que permitam uma classificação mais objetiva e fidedigna, foi realizada uma análise retrospectiva dos neoplasmas em felinos, provenientes de biópsias e necropsias enviadas ao Laboratório Regional de Diagnóstico (LRD) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), no período de 1979 a 2007. A partir desta revisão realizou-se um estudo epidemiológico baseada nos dados de 55 neoplasmas mamários diagnosticados nesse período. Os tumores foram classificados de acordo com a descrição histológica para tumores mamários felinos. Para isso utilizaram-se critérios apresentado por Misdorp (2002) apoiado pela OMS/AFIP. Pela classificação histológica descritiva proposta foram encontradas as seguintes alterações: Três adenomas simples, sete alterações fibroadenomas e quarenta e cinco tumores malignos. Já a graduação histológica foi estabelecida de acordo com o sistema de Elston & Ellis (1991). A graduação foi realizada nos carcinomas mamários felinos que totalizaram 45 amostras recuperadas. Sendo 26 classificados como grau II, seguido por 13 de grau I e por último 6 de grau III. Os objetivos do presente estudo foram comparar a eficiência de dois métodos de classificação histológica para estes tumores: a histologia descritiva e a graduação histológica, e ainda verificar fatores prognósticos de carcinomas felinos pela técnica de quantificação de AgNORs em tumores mamários felinos. Observando-se uma média de 5,34 AgNORs/núcleo (amplitude de 2,06 a 7,88). As contagem de AgNORs foram avaliadas considerando o sistema de graduação histológica. Foram realizadas comparações entre os valores de AgNOR/núcleo através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para amostras independentes. 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:** Estudo Retrospectivo. Classificação histológica. AgNOR. Fatores prognósticos. Felinos.

## Abstract

SPADER, Melissa Borba, **Epidemiological study, histological classification, and prognostic factors of quantification of AgNORs breast tumors in cats.** 2009, 57p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

In order to study the feline mammary tumors and to seek methods that allow a more objective and reliable, we performed a retrospective analysis of neoplasms in cats from biopsies and autopsies sent to the Regional Diagnostic Laboratory (LRD) of the Federal University of Pelotas (UFPel) in the period 1979 to 2007. From this review there was an epidemiological study based on data from 55 breast neoplasms diagnosed in this period. The tumors were classified according to the histological description for feline mammary tumors. Were used for this criteria presented by Misdorp (2002) supported by WHO/AFIP. For the descriptive histological classification were the following: Three simple adenomas, seven amendments fibroadenomatous and forty-five malignant tumors. Already the histological grading was established according to the system of Elston & Ellis (1991). The graduation was held in feline mammary carcinomas which totaled 45 samples recovered. Being 26 classified I eat degree II , followed for 13 of degree I & for last 6 of degree III. The targets of the present I study have been comparing the efficiency of two methods of classification histological about to these tumors : the histology descriptive and the gradation histological, and again verify factors prognosis of carcinomas feline by technique of quantification of AgNORs breast tumors in cat. Most of these were classified as grade II, followed by grade I and grade III finally. The objective was to further investigate the relationship of these two methods of classification with the AgNOR indices. There was an average of 5.34 AgNOR/nucleus (range 2.06 to 7.88). The counting of AgNOR was evaluated considering the histological grading system. Comparisons were made between the values of AgNOR/nucleus by non-parametric test of Kruskal-Wallis for independent samples. It is concluded that the two classification systems are complementary, but the histological grading provides more detailed information on the possible biological behavior of these neoplasms, and that the mean AgNOR/nucleus tends to increase in tumors that show histological features of malignancy.

**Key words:** Retrospective study. Histological classification. AgNOR. Prognostic factors. Cats.

## Lista de Figuras

### Artigo 01

Figura 1. Critérios semi-quantitativo para a avaliação do grau histológico em carcinomas mamários proposto por Elston e Ellis (1991)..... 33

Figura 2. Número de carcinomas mamários felinos classificados de acordo com os sistemas de histologia descritiva e graduação histológica dentre as amostras recuperadas dos arquivos do LRD/UFPel no período de junho de 1979 a dezembro de 2007..... 33

### Artigo 02

Figura 1 - Sistema de avaliação do grau histológico em carcinomas mamários (Elston & Ellis, 1991)..... 39

Figura 2 – Média de AgNORs/núcleo das 55 amostras de tumores mamários felinos obtidos dos arquivos do LRD/UFPel no período de 1979 a 2007..... 40

## **Lista de Tabelas**

### Artigo 01

Tabela 1 - Número de carcinomas mamários felinos classificados de acordo com os sistemas de histologia descritiva e graduação histológica dentre as amostras recuperadas dos arquivos do LRD/UFPel no período de junho de 1979 a dezembro de 2007 .....	34
---	----

### Artigo 02

Tabela 1 - Contagem de AgNORs/núcleo dos 45 carcinomas, de acordo com sua graduação histológica.....	41
--	----

Tabela 2 - Contagem de AgNORs/núcleo dos 55 tumores de acordo com sua classificação histológica descritiva.....	42
---	----

## Sumário

Agradecimentos .....	5
Resumo .....	6
Abstract .....	7
Lista de Figuras .....	8
Lista de Tabelas .....	9
Sumário .....	10
1. Introdução Geral.....	11
2. Revisão de Literatura .....	13
3. Artigo 01: Avaliação retrospectiva e comparação entre os sistemas histológico descritivo e de graduação histológica de neoplasmas mamários felinos.....	22
Resumo .....	23
Abstract .....	24
Introdução .....	24
Materiais e Métodos .....	25
Resultados .....	26
Discussão.....	27
Conclusões.....	30
Referências .....	30
4. Artigo 02: Uso da AgNOR como ferramenta prognóstica para tumores mamários.....	35
Resumo .....	36
Abstract .....	37
Introdução .....	37
Materiais e Métodos .....	38
Resultados .....	39
Discussão.....	42
Conclusão .....	44
Referências Bibliográficas .....	44
5. Conclusões.....	47
6. Referências Bibliográficas .....	48
Apêndice .....	55

## 1. Introdução Geral

O diagnóstico e o tratamento do câncer representam um dos maiores desafios com que se depara o veterinário moderno de pequenos animais. A incidência percebida do câncer em animais aumentou devido aos avanços nas técnicas diagnósticas e ao uso crescente da citologia e da histopatologia (DOBSON; GORMAN, 1988).

Existe na literatura internacional vários trabalhos de estudos epidemiológicos em pequenos animais que fornecem dados estatísticos importantes em relação à idade, sexo, raça, tipos de neoplasmas mais prevalentes e outros (DORN et al., 1968; PATNAIK et al., 1975). No Brasil, poucas informações se têm a respeito destes dados, principalmente no que diz respeito à espécie felina, colocando em dúvida se a casuística nacional se assemelha ou não à casuística estrangeira. As doenças neoplásicas ocorrem menos comumente em felinos do que em caninos, entretanto a forma maligna é a mais prevalente nos gatos, o que contribui por maiores taxas de mortalidade dos animais acometidos (SHIMIDT; LANGHAM, 1967).

No estudo da oncologia, o conhecimento do diagnóstico, do comportamento biológico e da evolução tumoral é muito importante para a escolha de terapias que auxiliem para aumentar a sobrevida no animal (SILVA; SERAKIDES; CASSALI, 2004). O aumento na casuística e a complexidade na evolução clínica dos tumores de mama nas gatas têm despertado interesse especial no estudo dos fatores de prognóstico. Mas determinar o prognóstico do paciente felino com neoplasia mamária pode ser difícil, já que o comportamento biológico desses tumores varia consideravelmente (KURZMAN; GILBERTSON, 1986).

Os fatores prognósticos podem ser definidos como sendo uma ou mais características clínicas, patológicas e biológicas dos indivíduos e de seus neoplasmas que permitem prever a evolução clínica e o tempo de sobrevida do paciente, sem que o mesmo tenha sido submetido a terapias adicionais e adjuvantes, após a cirurgia (CAVALCANTI; CASSALI, 2006).

Existe uma ampla variedade de métodos para avaliar fatores prognósticos. Estes foram descobertos pela pesquisa, mas somente poucos são também aplicáveis em tecidos inclusos em parafina. Nos últimos anos, a técnica AgNOR (Regiões Nucleolares Organizadas coradas pela Prata [Ag]) vem se tornando um

método amplamente utilizado na patologia tumoral, principalmente para a avaliação da agressividade de neoplasmas malignos e do seu prognóstico (MELLO; ALVES, 1999; FONSECA; DALECK, 2000; KORNEYEV et al., 2000; MENDES, 2006). Outros métodos têm sido desenvolvidos no estabelecimento do prognóstico, como a utilização de marcadores imuno-histoquímicos, técnicas para avaliação de neovascularização e potencial proliferativo dos neoplasmas mamários que acometem as cadelas (QUEIROGA; LOPES, 2002).

Em relação ao método de classificação morfológica revisado por Misdorp (2002) e apoiado pela OMS/AFIP, Castagnaro et al. (1998), afirmam que a avaliação morfológica do grau de diferenciação fornece uma informação prognóstica útil no câncer de mama humano. Uma modificação do método original de Bloom & Richardson por Elston (1982), foi aplicada com sucesso em vários estudos em animais como um fator prognóstico independente (ELSTON; ELLIS, 1991).

Deve-se salientar que o importante não é a sofisticação do modelo adotado para a obtenção do prognóstico, mas sim a qualidade dos dados obtidos para construí-los e validá-los (DERENZINI, 2000).

Os objetivos do presente estudo foram comparar a eficiência de dois métodos de classificação histológica para estes tumores: 1) a histologia descritiva da Organização Mundial da Saúde/Instituto de Patologia das Forças Armadas Americana (OSM/AFIP), revisada por Misdorp (2002) e 2) a graduação histológica proposta por Elston & Ellis (1991) e ainda verificar fatores prognósticos de carcinomas felinos pela técnica de quantificação de AgNORs.

## **2. Revisão de Literatura**

### **Introdução**

As neoplasias têm surgido em grande quantidade, não só em humanos, como também em animais, sendo indicada como uma das maiores causas de óbito em cães e gatos (BALDIN et al., 2005). Neoplasmas são problemas comuns na clínica veterinária de pequenos animais, e com a melhoria das práticas e métodos investigativos, doenças neoplásicas em cães e gatos são cada vez mais diagnosticadas. Embora dados sobre incidência de tumores em cães e gatos sejam escassos, estimativas conservadoras sugerem que 1 entre cada 10 gatos ou cães irá desenvolvê-los durante sua vida natural (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 1999).

Os tumores de glândula mamária de cães e gatos têm um interesse especial para os oncologistas em função das suas similaridades com o câncer de mama humano. Muitos trabalhos demonstram a importância do estudo destas lesões neoplásicas na espécie canina e felina como modelo comparativo para a espécie humana (CASSALI, 2000).

No estudo da oncologia o conhecimento do diagnóstico, do comportamento biológico e da evolução tumoral é muito importante para a escolha de terapias que auxiliem para aumentar a sobrevida no animal (SILVA; SERAKIDES; CASSALI, 2004).

### **Histologia e Fisiologia**

Nas gatas, as glândulas mamárias apresentam-se sob a forma de linhas mamárias subepidermais (DYCE; SACK; WENSING, 1996). São consideradas glândulas secretoras especializadas resultantes da invaginação da epiderme durante a embriogênese, a qual gera uma série de ductos que se conectam ao ambiente externo (KNUDSEN; WHEELLOCK, 2005). Seu desenvolvimento inicia na fase embrionária e continua lentamente até o período da pré-puberdade (CAVALCANTI; CASSALI, 2006). O desenvolvimento da glândula mamária só é efetivado na presença dos hormônios da gestação e da lactação, que induzirão a ramificação e estimularão a proliferação de células germinativas finais e a diferenciação em alvéolos glandulares que produzirão o leite. Após o

desmame, o alvéolo regride por apoptose e as estruturas ductais são mantidas (KNUDSEN; WHEELLOCK, 2005; BERTAGNOLI, 2006).

Quando ativa, a glândula mamária é uma grande glândula túbulo alveolar composta que atua na secreção do leite e este, por sua vez, é constituído por uma mistura de nutrientes como: lactose, lipídios, proteínas, minerais, vitaminas adicionadas a anticorpos, linfócitos e monócitos necessários para a sustentação e proteção do neonato. São secretados de forma apócrina e merócrina pelos adenômeros túbulos-alveolares que são organizados em um número variável de lobos, dependendo da espécie (SAMUELSON, 2007).

Na mama em lactação, os abundantes alvéolos tornam-se preenchidos com secreção e o tecido conjuntivo interlobular é reduzido a septos relativamente finos. Vários alvéolos se mantêm distendidos, enquanto outros aparecem quase vazios. Esta distensão varia com a frequência de amamentação e a quantidade de leite removido (CORMACK, 1991).

Entretanto, quando inativa após um período de lactação, a glândula mamária passa por um processo de involução. A extensão do parênquima é reduzida especialmente às unidades secretoras que consistem de epitélio cúbico simples e células mioepiteliais comparativamente pronunciadas. Como resultado de um período anterior de lactação pode haver corpos de coloração escura nos ductos e no tecido intersticial que representam condensações de caseína e são conhecidos como corpos amiláceos (SAMUELSON, 2007).

### **Epidemiologia**

O tumor mamário é o terceiro tumor mais comum na gata, depois dos neoplasmas hematopoiéticos e dos cutâneos. A incidência de tumores mamários no gato é menos da metade observada em humanos e cães. Também têm sido relatados em machos 1-5% dos tumores felinos, embora menos freqüentemente, e ao menos 85% dos tumores que acometem todos os felinos são malignos (WITHROW; MaCEWEN, 1996).

Alguns trabalhos indicam a associação da raça como fator predisponente para tumores mamários, em gatos siameses e domésticos de pêlo curto, parece ter alta taxa de incidência, podendo ter duas vezes o risco

de outras raças a desenvolverem o tumor mamário (QUEIROGA; LOPES, 2002).

Neoplasmas mamários têm sido relatados em gatos com idade de nove meses a 23 anos de idade, com média de idade de 10 a 12 anos. Um estudo sugeriu que a doença ocorre mais precocemente em siameses e que a incidência nesta raça alcança um platô aos 9 anos de idade (NELSON; COUTO, 1992; WITHROW; MaCEWEN, 1996; BELLA, 1998; HEDLUND, 2002).

### **Apresentação clínica**

Os gatos com tumores mamários são apresentados freqüentemente ao veterinário com uma massa notável na cadeia mamária. As massas são geralmente firmes, nodulares e invasivas. Freqüentemente há uma aderência à pele e à parede abdominal subjacente. Ao menos 25% dos pacientes têm massas ulceradas. Mais de 50% de gatos afetados têm mais de uma glândula envolvida, prejudicada pela extensão direta ou pela presença de tumores múltiplos (JUNIOR, 2001).

O tamanho dos tumores pode variar, desde pequenos nódulos com 0,5cm de diâmetro, até tumores com mais de 15cm no seu maior eixo (QUEIROGA; LOPES, 2002). O padrão histológico varia consideravelmente entre tumores diferentes e áreas dentro de um mesmo tumor (MISDORP, 2002).

Efeitos sistêmicos de neoplasmas surgem em estágios mais avançados da doença. É comum aos animais desenvolverem anorexia, perda de peso e se tornarem letárgicos. A caquexia ocorre como resultado do estado avançado da neoplasia. A pressão de órgãos ocasionada pelo tumor, e a dor, que acontece na maioria das vezes, fazem com que o animal fique o mais quieto possível, sem se deslocar e até mesmo sem se alimentar. Em estágios avançados podem ocorrer infecções bacterianas secundárias agravadas por tratamentos imunossupressores. A febre pode ser originada em função da liberação de pirogênios por algumas células tumorais (JUNIOR, 2001).

### **Avaliação clínica**

Durante o exame físico devem-se explorar as duas cadeias mamárias e os gânglios linfáticos regionais. Avaliação radiológica deve ser realizada a fim

de avaliar a existência de metástases em pulmões e nódulos linfáticos esternais. Por vezes é aconselhável avaliar a região sublombar, realizando radiografias abdominais caudais e ecografia abdominal (QUEIROGA; LOPES, 2002).

A avaliação clínica das neoplasias mamárias requer a determinação dos seguintes fatores no animal: condições gerais; sinais clínicos; durações dos sinais; velocidade de crescimento; localização; tamanho; consistência; glândulas envolvidas; crescimento; ulceração; aderência; aumento dos linfonodos; linfedema de extremidades; deformidade da mama; recorrência e presença de metástase (PIEKARZ, 2007).

### **Fatores Prognósticos**

O aumento na casuística e a complexidade na evolução clínica dos tumores de mama nas cadelas e gatas têm despertado interesse especial no estudo dos fatores de prognóstico. Mas determinar o prognóstico do paciente canino e felino com neoplasia mamária pode ser difícil, já que o comportamento biológico desses tumores varia consideravelmente (KURZMAN; GILBERTSON, 1986).

O conhecimento dos fatores prognósticos é de fundamental importância na determinação dos programas terapêuticos. Uma terapia baseada em uma avaliação prognóstica possibilita a aplicação das diferentes modalidades terapêuticas utilizadas no tratamento do câncer com a intensidade e a efetividade adequadas e individualizadas para aquele paciente específico (VITASEK; DENDISOVA, 2006).

Os fatores prognósticos podem ser definidos como sendo uma ou mais características clínicas, patológicas e biológicas dos indivíduos e de seus neoplasmas que permitem prever a evolução clínica e o tempo de sobrevida do paciente, sem que o mesmo tenha sido submetido a terapias adicionais e adjuvantes após a cirurgia (CAVALCANTI; CASSALI, 2006).

Fatores epidemiológicos, como a idade avançada do animal no momento do diagnóstico de um neoplasma mamário, podem interferir negativamente no prognóstico, diminuindo o tempo de sobrevida livre de doença neoplásica após a cirurgia (PEREZ ALENZA et al., 1998). Número de gestações, idade na primeira gestação, duração e regularidade do ciclo estral, castração e uso de

contraceptivos são fatores que revelam o estado reprodutivo das fêmeas. Estes fatores podem produzir resultados controversos e, na grande maioria das vezes, não demonstram ter valor significativo como bons indicadores prognósticos (HELMÉN et al., 1993; PEREZ ALENZA et al., 1998). Em gatas, ainda não foi estabelecida a idade em que a castração confere proteção contra o surgimento de neoplasmas de mama (NELSON; COUTO, 1992). Segundo HEDLUND (2002), as gatas ovariectomizadas antes de um ano de idade têm um risco de 0,6% de desenvolvimento de carcinomas mamários em comparação com gatas intactas. A ovariectomia adjuvante a mastectomia também não influencia no tempo de sobrevivência do paciente portador de neoplasma; sua finalidade consiste na eliminação da possibilidade de ocorrência de afecção de todo o trato reprodutivo.

O tamanho do tumor é considerado como um fator de prognóstico independente, pois tumores menores que 3cm de diâmetro estão associados com um prognóstico significativamente melhor que os acima desta medida (SORENMO, 2003). Sabe-se que o risco de desenvolvimento de metástase aumenta com a presença de células neoplásicas em linfonodos, com o maior tamanho do tumor primário e com a perda da diferenciação histopatológica (PIEKARZ, 2007).

A aplicação da imuno-histoquímica tem trazido informações úteis (MISDORP, 2002), pois permite determinar, com maior precisão, a presença de marcadores hormonais, a taxa de proliferação celular, a angiogênese e a presença de produtos de proto-oncogenes e de genes supressores tumorais (BERTAGNOLI, 2006).

Existe uma ampla variedade de métodos que foram descobertos pela pesquisa, mas somente poucos são também aplicáveis em tecidos inclusos em parafina. A atividade proliferativa celular é representada pelo aumento de Regiões Organizadoras Nucleolares por núcleo (NORs/núcleo). Nos últimos anos, a técnica AgNOR (Regiões Nucleolares Organizadas coradas pela Prata [Ag]) vem se tornando um método amplamente utilizado na patologia tumoral, principalmente para a avaliação da agressividade de neoplasmas malignos e do seu prognóstico (MELLO; ALVES, 1999; FONSECA; DALECK, 2000; KORNEYEV et al., 2000; MENDES, 2006).

É importante, no entanto, definir qual ou quais fatores prognósticos, entre os muitos descritos até agora, merecem ser considerados úteis na prática diária. Deve-se salientar que o importante não é a sofisticação do modelo adotado para a obtenção do prognóstico, mas sim a qualidade dos dados obtidos para construí-los e validá-los (DERENZINI, 2000).

### **Diagnóstico Definitivo**

O intervalo entre a identificação do tumor pelo proprietário e a apresentação do paciente ao veterinário para o diagnóstico e tratamento, geralmente é grande. Vários proprietários relatam ter observado o tumor há meses ou anos e buscam atendimento após crescimento excessivo ou ulceração. O diagnóstico e tratamento precoce dos tumores de mama proporcionariam um melhor prognóstico para os pacientes, além da redução de custos com o tratamento (JUNIOR, 2001).

O diagnóstico inicial de neoplasma mamário baseia-se nos sinais particulares da fêmea (idade e idade por ocasião da ovariectomia, e se esta cirurgia foi realizada), historia clinica (dos ciclos reprodutivos, lactação ou terapia a base de estrógenos), exame físico, hemograma, perfil bioquímico sérico, urinálise e radiografias torácicas e abdominais (projeções lateral direita e esquerda e ventro-dorsal) (MACAW, 1996; BELLA, 1998, HEDLUND, 2002).

Em medicina veterinária, o diagnóstico histopatológico deve ser realizado em todos os casos de neoplasmas mamários submetido à exérese cirúrgica (BERTAGNOLI, 2006). O melhor meio de se obter um diagnóstico definitivo é por meio do exame histológico da biópsia excisional (RUTTEMAN; WHITHROW; MACEWEN, 2001; BERTAGNOLI, 2006). O exame citológico de amostras é obtido por biópsia pelo método de Punção Aspirativa com Agulha Fina (PAAF), de secreções dos mamilos ou rapados das superfícies ulceradas das massas mamárias. Deverá ser efetuado em todos os casos devido à facilidade e ao baixo custo destes procedimentos (BELLA, 1998). O sucesso da CAAF depende das diversas fases de condução da técnica, desde a obtenção da amostra, da preparação da lâmina e sua coloração, até o exame citoscópico do material aspirado. Por outro lado, WITHROW e MACEWEN (1996) não consideram a biópsia aspirativa com agulha fina a técnica diagnóstica mais indicada, pois a maioria dos tumores da cadela são mistos, havendo

necessidade de vários pontos de coleta, e a distinção entre material benigno ou maligno não implicaria mudanças na conduta operatória. Esta técnica é considerada muito útil nos linfonodos suspeitos de metástase (ZUCCARI; SANTANA; ROCHA, 2001).

O risco de disseminação está correlacionado ao tipo tumoral, diferenciação histológica e vários fatores clínicos de prognóstico. Em geral, os tumores epiteliais provocam metástases, pela circulação linfática, para linfonodos regionais e pulmões, enquanto os tumores mesenquimais se disseminam pela via hematogena diretamente para os pulmões (SORENMO, 2003). Portanto, os principais órgãos acometidos pelas lesões metastáticas são os linfonodos regionais (inguinais e axilares) e pulmões e, com menor frequência, rins, fígado, baço, pele, adrenais, encéfalo, olhos e esqueleto (CAVALCANTI; CASSALI, 2006; PIEKARZ, 2007).

Devido à elevada incidência de tumores de mama em cadelas, seu estudo vem crescendo em relação a outras afecções. Todo aumento de tecido mamário deve ser avaliado para possíveis neoplasias. Aumentos generalizados que não estejam relacionados com pseudociese, lactação ou mastite devem receber atenção especial. De forma semelhante, tumores de origem diversa daquele do tecido mamário podem aparecer com frequência na região das glândulas mamárias, sendo este fato de grande importância, pois diferentes tratamentos podem ser indicados para tumores como linfossarcomas, lipomas e mastocitomas (ZUCCARI; SANTANA; ROCHA, 2001).

Lesões Inflamatórias como a mastite aguda estão habitualmente associadas a uma lactação. Há hipertermia e dor local, confinados ao tecido mamário. A glândula se apresenta inflamada, com consistência variável, até flutuante sem abscesso, há supuração por pressão. Pode haver comprometimento geral, manifestado como apatia e febre. A abscedação requer limpeza cirúrgica, e em qualquer fase é preciso antibioticoterapia, antiinflamatórios e analgésicos. No entanto, na hiperplasia mamária, uma afecção específica da gata, o aumento de volume não inflamatório não neoplásico é freqüente e tem grande significado prognóstico o seu reconhecimento, como diagnóstico diferencial de neoplasia (JUNIOR, 2001)

A avaliação histopatológica de neoplasmas mamários e da rede linfática fornecem informações importantes sobre a sua natureza, tipo histológico e a extensão microscópica da lesão, auxiliando na determinação do prognóstico (CAVALCANTI; CASSALI, 2006).

### **Classificação dos tumores**

A metodologia para a classificação dos tumores varia consideravelmente, porém há um consenso geral para as seguintes categorias: adenomas, carcinomas e tumores mistos benignos e malignos (MOULTON, 1990). A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica os tumores de mama da gata em tumores malignos, benignos, não classificados e hiperplasias ou displasia mamária. As neoplasias malignas são: o carcinoma *in situ*, carcinoma complexo, carcinoma simples com os subtipos tubulopapilar, sólido, e cribiforme; tipos especiais de carcinoma, que agrupam o carcinoma de células fusiformes; tumores de células escamosas, o mucinoso; sarcomas tais como fibrossarcoma, osteossarcoma e outros sarcomas (MISDORP et al., 1999). Nos tumores benignos estão agrupados os adenomas simples, complexo e basalóide, os fibroadenomas de baixas e altas celularidade, o tumor misto benigno e o papiloma ductal (BERTAGNOLI, 2006).

A hiperplasia fibroepitelial também conhecida como hipertrofia mamária felina, alteração fibroadenomatosa total ou parcial, adenomatose mamária felina ou fibroadenoma juvenil é uma condição não neoplásica, responsiva a progesterona, caracterizada por uma rápida hipertrofia e hiperplasia ou proliferação do estroma e epitélio ductal das glândulas mamárias. Embora os autores concordem que se trata de uma lesão clinicamente benigna, alguns consideram este super crescimento fibroepitelial uma forma de displasia mamária, enquanto outros a tratam como neoplasia mamária. São bem delimitados, mas não encapsulados, variando de tamanho (FONSECA; DALECK, 2000).

Freqüentemente, mais de uma glândula são afetadas, apresentando edema, ulceração, áreas de necrose e infecção bacteriana secundária. Neste caso, o diagnóstico definitivo só pode ser realizado através de biópsia com análise histopatológica subsequente. Existe uma proliferação dos ductos lactíferos, assim como do estroma adjacente, que contém grande quantidade

de fibroblastos. Os ductos mamários são formados por várias camadas de células epiteliais cúbicas, com nucléolo proeminente. As células mioepiteliais contendo núcleo ovóide circundam os ductos. O tamanho dos núcleos e das células é variável e as camadas de células são desorganizadas. É comum encontrar figuras de mitose e atividade secretória aumentada. O estroma consiste de tecido conectivo frouxo com abundante matriz extracelular e colágeno. Os capilares sanguíneos são mais numerosos e mais próximos dos ductos mamários (HOFFMANN, 2000). A terapia comum da hiperplasia fibroepitelial mamaria felina é ovariohisterectomia ou mastectomia. Assim, até recentemente, a ovariectomia foi considerado o tratamento da escolha, conduzindo à regressão do tecido mamário dentro de três a quatro semanas. Como um tratamento alternativo, a administração dos anti progestágenos foi introduzida por VITASEK; DENDISOVA (2006).

Os adenomas podem ser simples ou complexos, dependendo do padrão de crescimento predominante. São neoplasias epiteliais benignas, com origem nos ácinos mamários, ou nos pequenos ductos intralobulares. Macroscopicamente, esses tumores são bem circunscritos e sólidos, mas podem conter cistos disseminados. Ao microscópio óptico, observamos que as células neoplásicas são cubóides e estão dispostas em ácinos compactados e bem diferenciados, com dimensões variáveis, ou em túbulos alongados, ocasionalmente apresentando ramificações. Os lumens dos ácinos ou túbulos neoplásicos podem conter uma secreção rica em proteína. As margens da neoplasia são bem definidas e os tecidos adjacentes podem ser comprimidos, indicando um crescimento por expansão e não por invasão (MISDORP, 2002)

Os carcinomas são neoplasias malignas podendo originar-se de células epiteliais dos ductos mamários, ductos interlobulares, ductos intralobulares e do epitélio secretório dos ácinos (alvéolos). Cada tipo também pode estar acompanhado por uma proliferação concomitante de células mioepiteliais, circundadas por uma matriz condromucínica. Na ausência dessa característica, a neoplasia é chamada carcinoma simples, mas quando ela está presente, a neoplasia passa a receber a denominação de carcinoma complexo (JONES; HUNT; KING, 1997).

### 3. Artigo 01

#### **Avaliação retrospectiva e comparação entre os sistemas histológico descritivo e de graduação histológica de neoplasmas mamários felinos \***

Melissa Borba Spader<sup>1</sup>, Josiane Bonel-Raposo<sup>2</sup>, Cristina Gevehr Fernandes<sup>2</sup>, Tatiane Camacho Mendes<sup>2</sup>

\*Artigo originado da Dissertação de Mestrado do primeiro autor, 1 Programa de Pós-Graduação em Veterinária (PPGV), Faculdade de Veterinária (FV), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas/RS. 2 Departamento de Patologia Animal, FV-UFPel. Correspondência: M. B. SPADER [melispader@gmail.com]

\*\*Artigo encaminhado para publicação na *Acta Scientiae Veterinariae* – POA/RS, formatado conforme exigido pela Revista.

**Avaliação retrospectiva e comparação entre os sistemas histológico descritivo e de graduação histológica de neoplasmas mamários felinos \***

Melissa Borba Spader<sup>1</sup>, Josiane Bonel-Raposo<sup>2</sup>, Cristina Gevehr Fernandes<sup>2</sup>, Tatiane Camacho Mendes<sup>2</sup>

\*Artigo originado da Dissertação de Mestrado do primeiro autor, 1 Programa de Pós-Graduação em Veterinária (PPGV), Faculdade de Veterinária (FV), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas/RS. 2 Departamento de Patologia Animal, FV-UFPel. Correspondência: M. B. SPADER [melispader@gmail.com]

**RESUMO**

Realizou-se um estudo retrospectivo da casuística de tumores mamários de felinos enviados ao Laboratório Regional de Diagnósticos da Universidade Federal de Pelotas (LRD/UFPel) no período de 1979 a 2007. Os casos foram selecionados, a partir de arquivos de dados e protocolos, e reclassificados aplicando-se dois métodos de classificação histológica para tumores: 1) a histologia descritiva da Organização Mundial da Saúde/Instituto de Patologia das Forças Armadas Americana (OSM/AFIP) e o 2) sistema de graduação histológica proposto por Elston & Ellis (1991). Estas duas classificações foram aplicadas em 45 casos diagnosticados como carcinomas mamários felinos, com o objetivo de evidenciar equivalência nos métodos, ou se estes se contrapõem ou se complementam na determinação do potencial de malignidade de tumores mamários felinos. A partir desse estudo verificou-se que a maioria dos carcinomas pertencia ao grau II 57,8% (26/45), seguido pelo grau I 28,9% (13/45) e por último grau III 13,3% (6/45). Ao analisarmos os escores, foi observado que a maioria dos tumores, 37,8% (17/45), encontrava-se concentrada no escore 6, que é limítrofe do grau I, e o restante estava distribuído entre os outros escores. Podemos concluir que os

dois sistemas são importantes e se complementam sendo que a graduação histológica fornece informação mais completa sobre o comportamento biológico destes neoplasmas.

**Descritores:** neoplasma mamário, classificação histológico-descritiva, felinos.

### **ABSTRACT**

Was a retrospective study of case series of breast tumors in cats submitted to the Regional Diagnostic Laboratory, Federal University of Pelotas (LRD / UFPel) in the period 1979 to 2007. The cases were selected from data files and protocols, and reclassified according to two methods of histological classification for tumors: 1) the descriptive histology of the World Health Organization / Institute of Pathology Armed Forces American (OSM / AFIP) and 2) histological grading system proposed by Elston & Ellis (1991). These two classifications were applied in 45 cases diagnosed as breast cancer cats, comparing them with the objective of demonstrating that both methods are equivalent, compared with or complement in determining the potential for malignancy of breast tumors cats. From this study it was found that most carcinomas belonged to grade II 57.8% (26/45), followed by grade I 28.9% (13/45) and finally level III 13.3% (6 / 45). When analyzing the scores, it was observed that most tumors, 37.8% (17/45), was concentrated in the score 6, which is adjacent to the degree I, and the remainder was distributed among the other scores. We conclude that both systems are important and are complementary, and histological grading provides more complete information on the biological behavior of these neoplasms.

**Key words:** breast neoplasm, histological classification descriptive, cats

### **INTRODUÇÃO**

Com exceção dos tumores de pele e do tecido linfo-hematopoiético, os neoplasmas mamários são os mais comuns em felinos domésticos, ocupando o terceiro

lugar em importância, sendo que 80 a 90% deles são malignos e manifestam-se de forma mais agressiva que nos cães [12,16]. Esses tumores podem ter tanto origem epitelial, mesenquimal e/ou de ambos [6]. Fatores prognósticos fidedignos são de grande importância para estimar o prognóstico da doença [13].

O objetivo do presente estudo foi de comparar a eficiência de dois métodos de classificação histológica para estes tumores: 1) a histologia descritiva da Organização Mundial da Saúde/Instituto de Patologia das Forças Armadas Americana (OMS/AFIP), revisada por Misdorp (2002) [10] e 2) a graduação histológica proposta por Elston & Ellis (1991) [5].

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Para realização deste estudo, primeiramente foram obtidos dos arquivos do LRD/UFPel dados de protocolos de todas as afecções que acometeram felinos. Do total de amostras recebidas para diagnóstico histopatológico, entre o período de junho de 1979 a dezembro de 2007, foram selecionados os casos de neoplasmas mamários em fêmeas felinas.

Os tumores mamários foram avaliados por microscopia de luz e classificados por dois diferentes métodos. O primeiro trata-se do sistema histológico descritivo preconizado pela OMS/AFIP [10, 11], em neoplasmas malignos, neoplasmas benignos, hiperplasias e alterações fibroadenomas da glândula mamária. Os neoplasmas malignos foram, por sua vez, classificados na seguinte ordem crescente de malignidade: carcinoma não infiltrativo (*in situ*), carcinoma complexo, carcinoma simples (subtipos tubulopapilar, sólido, cribriforme e anaplásico), sarcomas (subtipos fibrossarcoma, osteossarcoma, carcinosarcoma e outros sarcomas), carcinoma de tipos especiais (subtipos fusiforme, com diferenciação escamosa e mucinoso) e carcinoma ou sarcoma em tumor benigno. Já o segundo sistema de classificação consiste no método proposto

por Elston & Ellis (1991) [5], que se baseia numa análise histológica semi-quantitativa e considera essencialmente três parâmetros (Figura 1) totalizando escores que permite graduar o nível de malignidade. De acordo com esse método os neoplasmas são classificados como de grau I, grau II ou grau III, os quais se referem a graus crescentes de malignidade.

## **RESULTADOS**

De um total de 834 casos de diagnósticos em felinos 172 (20,6%) eram amostras de neoplasmas, dentre as quais foram encontrados 77 casos diagnosticados como tumores mamários.

Dentre estes 77 casos, foram recuperados dos arquivos do LRD/UFPel 55 amostras inclusas em parafina. A partir destas, foram confeccionadas novas lâminas histológicas, coradas com hematoxilina-eosina [2].

Posteriormente estas 55 amostras recuperadas foram avaliadas para obter-se a classificação histológica descritiva as quais pertenciam. Verificou-se, então, que desses 55 (100%) neoplasmas, 45 (81,8%) eram neoplasmas malignos, 3 (5,5%) eram neoplasmas benignos e 7 (12,7%) alterações fibroadenomas pela classificação histológica descritiva.

A partir da classificação pelo critério histológico descritivo, observou-se que o tipo de tumor mais encontrado foram os tumores malignos (45): sendo que 37,8% (17/45) eram carcinomas tubulopapilares, 24,5% (11/45) carcinomas sólidos, 24,5% (11/45) carcinomas cribriformes, 4,4% (2/45), carcinomas fusiformes, 4,4% (2/45), carcinomas com diferenciação escamosa, 2,2% (1/45) carcinomas mucinosos e 2,2% (1/45) carcinossarcomas.

Realizou-se então a graduação dos 45 neoplasmas malignos pelo sistema de Elston & Ellis (1991) [5]. Verificou-se que 28,9% (13/45) pertenciam ao grau I, 57,8%

(26/45) ao grau II e 13,3% (6/45) ao grau III. Dos 13 neoplasmas grau I dois possuíam escore 3, três escore 4 e oito escore 5. Já os neoplasmas grau II, dezessete obtiveram escore 6 e nove escore 7. Dos neoplasmas grau III cinco foram categorizados com escore 8 e um com escore 9 (Figura 2).

Ao comparar os achados da classificação pela morfologia descritiva com os da graduação histológica, observou-se que dos 17 carcinomas tubulopapilares, 11 apresentaram grau II, sendo que a maioria destes (9) encontrou-se concentrada no escore 6, que é limítrofe do grau I de malignidade. Já 6 tumores apresentaram grau I, com maior número concentrado no escore 4. Não foi observado nenhum carcinoma tubulopapilar com grau III. Entre os carcinomas sólidos, o grau II de malignidade foi o mais observado, seguido do grau III e um caso de grau I, com escore 3. Os carcinomas cribriformes que tiveram uma boa representação (11) apresentaram números equivalentes no grau I e II de malignidade e somente um caso apresentou grau III concentrado no escore 8. Já os carcinomas fusiformes e os carcinomas com diferenciação escamosa apresentaram grau II, concentrados no escore 6, e grau III, com escore 8. Ainda, observou-se que o único carcinosarcoma apresentou grau II de malignidade, concentrado no escore 7 e o carcinoma mucinoso (1) classificou-se no grau I, com concentração no escore 5 (Tabela 1).

## **DISCUSSÃO**

No presente estudo os neoplasmas mamários foram comuns em felinos, sendo 20,6% de todas as afecções por eles apresentadas. Estes dados são suficientes para demonstrar que ainda existem poucos estudos epidemiológicos abordando estes tópicos. Misdrorp (2002) [10] relata uma incidência de tumores mamários no gato em torno de 17%.

A partir da classificação histológica descritiva dos casos recuperados nesse trabalho, foi demonstrado a maior ocorrência de neoplasmas malignos, corroborando com os achados já citados na literatura. Carcinomas mamários felinos (CMF) são comuns em gatas, e representam uma causa importante de mortalidade nesta espécie [3]. CMF ocorrem em maior número que tumores benignos numa proporção de 4:1 a 9:1 e são conhecidos por seu prognóstico desfavorável e forte tendência para recorrência local [9,10,15]. A incidência dos CFM é elevada e exibem um comportamento biológico caracterizado por crescimento celular rápido, com alta taxa de proliferação celular [8].

Estes resultados são similares aos encontrados no presente estudo, onde o grau II ocorreu no maior número de casos. A avaliação histológica do grau de diferenciação fornece informação prognóstica útil. Seu valor como um fator prognóstico foi demonstrado por um estudo em um grande número de pacientes humanos, com acompanhamento durante um período de 10 anos [4]. Castagnaro (1998) [3] realizou um trabalho semelhante para investigar se o grau de diferenciação do CMF poderia sugerir o tempo de sobrevida pós-cirúrgico (TSP). Este autor avaliou tumores mamários retirados de gatas, os quais foram graduados de acordo com o método proposto por Elston & Ellis (1991) [5] e concluiu que o sistema de graduação pareceu ter um bom valor preditivo e prognóstico para os graus I e II porém foram desfavorável para o grau III de CMF [3]. Outros estudos similares foram realizados em caninos, como Mendes (2006) [8] que em seu trabalho avaliou 87 tumores mamários de cães e observou que a maioria desses animais encontrava-se na faixa do grau I e II, onde o prognóstico é reservado.

Os resultados deste trabalho, ao analisar a classificação histológica descritiva dos CMF, juntamente com a graduação histológica, evidenciaram que os carcinomas tubulopapilares distribuíram-se somente pelos graus I e II sendo 35,3% (6/17) no grau I

e 64,7% (11/17) no grau II. Considerando que nenhuma amostra de carcinoma tubulopapilar foi classificada no grau III, foi possível concluir que esse é um subtipo de menor malignidade. Mais de 80% dos tumores mamários felinos correspondem a carcinoma simples [14], sendo que as apresentações histológicas mais frequentes são os carcinomas tubulopapilar, sólidos e cribriforme [17].

Por outro lado os carcinomas sólidos se distribuía nos graus I em 9,1% dos casos (1/11), nos graus II, 63,6% (7/11) e III 27,3% (3/11), indicando um prognóstico mais desfavorável, concordando com Misdorp (2002) [10], que afirma que, dentre os carcinomas simples, o sólido é o subtipo histológico considerado de malignidade mais elevada.

No que tange aos carcinomas cribriformes, por sua vez, foram observados graus I em 45,4% (5/11) dos tumores, grau II em 45,4% (5/11) e grau III apenas em 9,2% (1/11) das amostras classificadas. Estes resultados atestam o que já foi citado por Misdorp (2002) [10], isto é, o alto potencial maligno desse subtipo.

No presente trabalho, os carcinomas fusiformes juntamente com os carcinomas com diferenciação escamosa compreenderam graus II e III. Mesmo levando-se em consideração o número de amostras relativamente pequeno, ou seja, duas amostras de cada subtipo, estes também foram considerados de malignidade elevada, já que em ambos nenhuma amostra foi graduada como grau I. A única amostra de carcinosarcoma foi classificada como grau II, e o carcinoma mucinoso, também com uma única amostra, como grau I, porém de escore 5. Esses neoplasmas são extremamente raros e no estudo foram considerados de malignidade intermediária. Além disso, é importante considerar que sarcomas, carcinomas de células escamosas e carcinomas mucinoso são menos comuns [17].

Estudos relatam que a sobrevida maior está relacionada com a graduação histológica sendo que quanto maior o grau, menor a sobrevida. Esta classificação também relaciona o grau com a diferenciação celular: grau I (carcinoma bem diferenciado); grau II (moderadamente diferenciado) e grau III (pouco diferenciado) [7].

Como já foi dito anteriormente, a graduação histológica também é importante na avaliação prognóstica, pois influencia na escolha das modalidades terapêuticas (cirurgia, quimioterapia, e radioterapia, entre outras), bem como na intensidade destes tratamentos, proporcionando uma terapia mais adequada e individualizada para o paciente específico [1].

## **CONCLUSÕES**

Quando utilizamos a graduação histológica, observamos que ela fornece maiores informações sobre o possível comportamento biológico dos neoplasmas. Isto é evidenciado principalmente nos subtipos sólidos e cribriforme, onde eles foram classificados dentro dos três graus, o que representa uma grande variação na apresentação histológica.

Com este estudo foi possível concluir que os dois sistemas de classificação (o sistema histológico descritivo e o sistema de graduação) são de grande importância prognóstica e são complementares quando usados concomitantemente, aumentando a eficácia do diagnóstico.

## **REFERÊNCIAS**

- 1 **Abreu E. & Koifman S. 2002.** Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 48: 113-31.

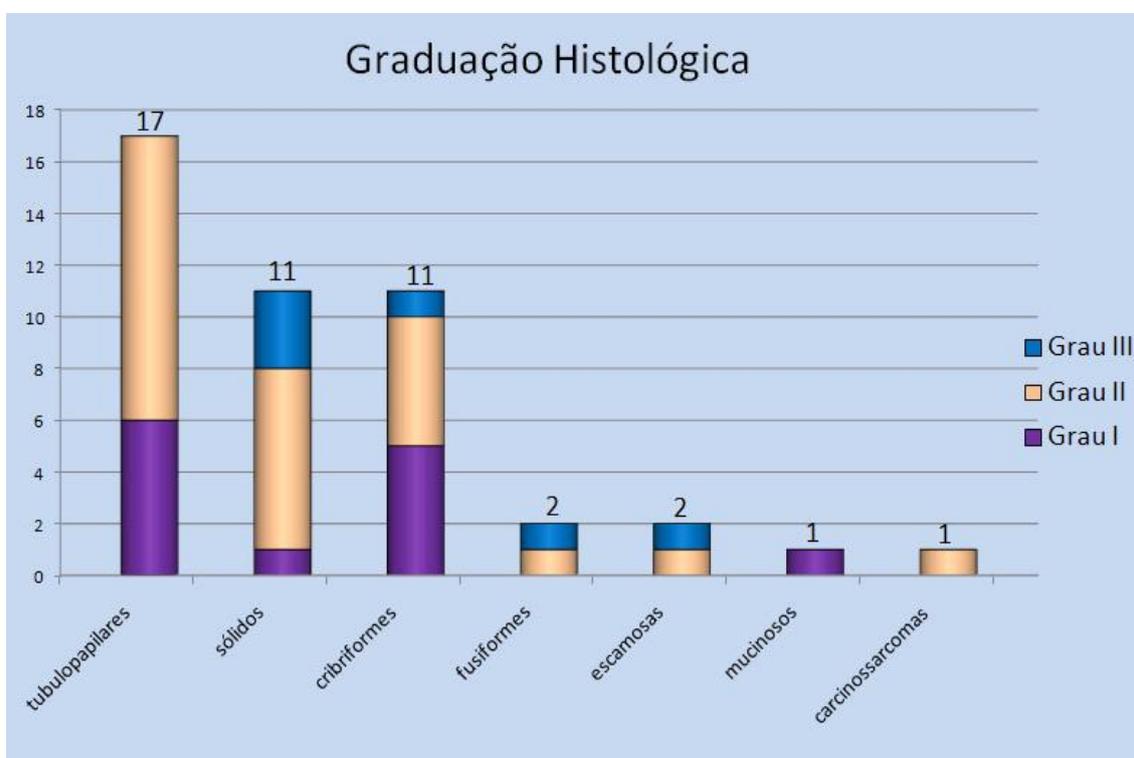
- 2 **Allen T.C. 1994.** Hematoxilin and eosin. In: Prophet E.B., Millis B., Arrington J.B., Sobin L.H. (Eds). *Laboratory Methods in Histotechnology – Armed Forces Institute of Pathology*: 53-57.
- 3 **Castagnaro M., Casalone C., Bozzetta E., Maria R., Biolatti B. & Caramelli M. 1998.** Tumour Grading and the One-year Post-surgical Prognosis in Feline Mammary Carcinomas, *The Journal of Comparative Pathology*. 119, 263-275.
- 4 **Dalton L.W., Page D.L., Dupont W.D. 1994.** Histologic grading of breast carcinoma. *Cancer*, 73: 2765-70.
- 5 **Elston C.W. & Ellis I.O. 1991.** Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 19, 403 – 410.
- 6 **Hellmén E., Moller M., Blankenstein M.A., Andersson L. & Westermark B. 2000.** Expression of different phenotypes in cell lines from canine mammary spindle-cell tumors and osteosarcomas indicating a pluripotent mammary stem cell origin. *Breast Cancer Research and Treatment*. 61, 197–210.
- 7 **Junior O.P.C. 2001.** Fatores prognósticos clínicos, anatomopatológicos e biomoleculares do câncer de mama - estágio clínico II. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP- SP.
- 8 **Mendes T.C. 2006.** Avaliação comparativa de dois sistemas de classificação histológica e da validade da quantificação da AgNOR para adenomas e carcinomas mamários caninos. 73f. Pelotas, RS. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.
- 9 **Millanta F., Calandrella M., Citi S., Della Santa D. & Poli A. 2005.** Over expression of HER-2 in Feline Invasive Mammary Carcinomas: An

Immunohistochemical Survey Evaluation of Its Prognostic Potential, *Veterinary Pathology*, 30-34.

- 10 **Misdorp W. 2002.** Tumors of the Mammary Gland. In: Meuten D.J. (Ed). *Tumors in Domestic Animals*. Iowa: Editor Iowa State Press, 4<sup>a</sup> ed., p. 575 – 606.
- 11 **Misdorp W., Else R.W., Hellmén E. & Lipscomb T.P. 1999.** Histological classification of mammary tumors of the dog and cat. Washington: Armed Forces of Pathology, 58p.
- 12 **Moulton J.E. 1990.** Tumors of the mammary gland. In: *Tumors in domestic animals*. California: California Press, 3rd ed. p.518-552.
- 13 **Mulas J. M. de las, Millán Y. & Dios R. 2005.** A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor  $\alpha$  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.
- 14 **Patnaik A.K., Liu S.K., Hurvitz A.I., McClelland A.J. 1975.** Non-hematopoietic neoplasms in cats. *Journal of the National Cancer Institute*, .54, 855-860.
- 15 **Queiroga & Lopes F. & Lopes C. 2002.** Tumores mamários caninos, pesquisa de novos factores de prognóstico. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. v. 97, p.119-27.
- 16 **Seixas F., Pires M. & Lopes C.A. 2007.** Complex carcinomas of the mammary gland in cats: Pathological and immunohistochemical features. *The Veterinary Journal*. 110-116.
- 17 **Withrow S.J. & MacEwen E.G. 1996.** Tumors of the mammary gland. In: *Small Animal Clinical Oncology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2nd ed., p.356-372.

Aspecto	Escore
<b>Formação tubular</b>	
Boa formação tubular (+ 75%)	1
Moderada formação tubular (+ 75%)	2
Pouca formação tubular (+ 75%)	3
<b>Pleomorfismo nuclear</b>	
Pequeno, uniforme e regular	1
Moderado aumento de tamanho	2
Marcada variação	3
<b>Contagem mitótica</b>	
0-7	1
8-10	2
+ 17	3
<b>Total do escore</b>	<b>Grau de malignidade</b>
3-5	I
6-7	II
8-9	III

**Figura 1.** Critérios semi-quantitativo para a avaliação do grau histológico em carcinomas mamários proposto por Elston e Ellis (1991)



**Figura 2.** Número de carcinomas mamários felinos classificados de acordo com os sistemas de histologia descritiva e gradação histológica dentre as amostras recuperadas dos arquivos do LRD/UFPel no período de junho de 1979 a dezembro de 2007

**Tabela 2.** Número de carcinomas mamários felinos classificados de acordo com os sistemas de histologia descritiva e graduação histológica dentre as amostras recuperadas dos arquivos do LRD/UFPel no período de junho de 1979 a dezembro de 2007

Tipos	Grau I			Grau II		Grau III		Total (%)
	3	4	5	6	7	8	9	
<b>Neoplasmas Malignos</b>								
Ca tubulopapilar	1	3	2	9	2	-	-	17 (37,8)
Ca sólido	1	-	-	3	4	2	1	11 (24,5)
Ca cribiforme	-	-	5	3	2	1	-	11 (24,5)
Ca mucinoso	-	-	1	-	-	-	-	1 (2,2)
Ca fusiforme	-	-	-	1	-	1	-	2 (4,4)
Ca diferenciação escamosa	-	-	-	1	-	1	-	2 (4,4)
Carcinossarcoma	-	-	-	-	1	-	-	1 (2,2)
<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>8</b>	<b>17</b>	<b>9</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>45 (100)</b>

Ca = Carcinoma

## 4. Artigo 02

### Uso da AgNOR como ferramenta prognóstica para tumores mamários felinos

#### *Use of AgNOR as prognostic tool for breast tumors cats*

SPADER<sup>1</sup>, Melissa Borba; BONEL-RAPOSO<sup>2</sup>, Josiane; FERNANDES<sup>2</sup>, Cristina Gevehr, GAMBÁ<sup>3</sup>, Conrado, SCHIMIT<sup>3</sup>, Bernardo

1 Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Veterinária (PPGV), Faculdade de Veterinária (FV), Pelotas/RS- Brasil.

2 Professora adjunta do departamento de Patologia Animal -FV-UFPel.

3 Alunos da graduação da FV- UFPel.

Correspondência: M. B. SPADER e-mail: [melispader@gmail.com](mailto:melispader@gmail.com)

\* Artigo submetido para publicação na **Revista Ciência Animal** – Ceará, formatado conforme exigido.

## Uso da AgNOR como ferramenta prognóstica para tumores mamários felinos

### *Use of AgNOR as prognostic tool for breast tumors cats*

SPADER<sup>1</sup>, Melissa Borba; BONEL-RAPOSO<sup>2</sup>, Josiane; FERNANDES<sup>2</sup>, Cristina Gevehr, GAMBÁ<sup>3</sup>, Conrado, SCHIMIT<sup>3</sup>, Bernardo

1 Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Veterinária (PPGV), Faculdade de Veterinária (FV), Pelotas/RS- Brasil.

2 Professora adjunta do departamento de Patologia Animal -FV-UFPel.

3 Alunos da graduação da FV- UFPel.

Correspondência: M. B. SPADER e-mail: melispader@gmail.com

### **RESUMO**

As neoplasias são problemas comuns na clínica veterinária e a melhoria de práticas e investigações dessas doenças fazem com que sejam cada vez mais diagnosticadas. O presente trabalho teve como objetivo verificar uma possível correlação entre os índices de AgNOR (Regiões Nucleolares Organizadas coradas pela Prata [Ag]) e o potencial de malignidade dos neoplasmas mamários felinos, classificado em dois métodos: a histologia descritiva Misdorp (2002), e a graduação histológica e respectivos escores proposto por Elston e Ellis (1991). Nesse estudo foram selecionados 55 tumores entre eles carcinomas, adenomas e alterações fibroadenomas. Quando avaliados pela morfologia descritiva foi observado que os tumores com maiores índices de AgNOR foram os carcinossarcomas e os carcinomas fusiformes. A contagem de AgNORs/núcleo dos tumores mamários felinos selecionados variou de 2,06 a 7,88, com média geral de 5,34. Os adenomas simples apresentaram uma média de 2,66 AgNORs/núcleo, inferior a média dos carcinomas (5,73 AgNORs/núcleo). Utilizando o método de classificação histológico descritivo, as contagens de AgNORs/núcleo foram distintas para cada subtipo. Foi possível observar que tumores classificados como grau III possuíam as maiores médias de AgNOR/núcleo. A técnica AgNOR é um método que pode ser utilizado para uma possível avaliação da agressividade e do prognóstico de neoplasias.

**Descritores:** felino, graduação, histológico-descritivo, neoplasma mamário

## ABSTRACT

As cancers are common in clinical veterinary and improvement of practice and research of these diseases are such that each time more diagnosed. This study aimed to verify whether this correlation between the rate of AgNOR technique (Regions stained nucleolar organized by Silver [Ag]), and the potential for malignancy of breast neoplasms cats, classified into two methods: a descriptive histology Misdorp (2002) and histological grading and respective score proposed by Elston and Ellis (1991). In this study we selected 55 tumors including carcinomas, adenomas and fibroadenomatous changes. When evaluated by descriptive morphology was observed that tumors with higher rates were carcinosarcoma, and spindle carcinomas. The number of AgNOR/nucleus of cats selected breast tumors, ranged from 2.06 to 7.88 with the overall average of 5.34. The simple adenomas showed an average 2.66 AgNOR/nucleus, below the average of the carcinomas that had an average of 5.73 AgNOR/nucleus. Using the method of histological classification description, the counts of AgNOR/nucleus were different for each subtype. Can be observed that tumors classified as grade III had the highest mean AgNOR/nucleon. The AgNOR technique is a method that can be used for a possible assessment of aggression and its prognosis.

**Key words:** breast neoplasm, cat, graduation histological-descriptive

## INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, dados epidemiológicos, clínicos e patológicos têm sido utilizados como parâmetros para avaliação prognóstica de animais portadores de neoplasmas mamários (Hellmén et al.1993; Misdorp; 2002). As características dos tumores mamários são extremamente variáveis, observando-se desde nódulos de aparência benigna até grandes massas com características malignas (Pérez Alenza et al., 1998). 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). Pesquisas histopatológicas em tecidos neoplásicos envolvem, direta ou indiretamente, a avaliação da proliferação celular, diferenciação celular e a regulação destes mecanismos (Oshima & Forones, 2001).

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).

Crocker et al. 1989, sugeriram que a técnica de AgNOR teria utilidade prática em patologia, para estimativa do potencial de agressividade e para avaliação de prognóstico de neoplasias malignas. Em vista disso, a quantificação das AgNORs foi introduzida na histopatologia como um marcador da atividade celular e nucleolar (Oshima & Forones, 2001).

Este trabalho teve como objetivo verificar uma possível correlação entre os índices de AgNOR e o potencial de malignidade dos tumores mamários felinos, definido por dois métodos tradicionais de classificação, a histologia descritiva revisada por Misdorp (2002) e apoiada pela Organização Mundial de Saúde/Instituto de Patologia das Forças Armadas Americanas (OMS/AFIP), e a graduação histológica proposta por Elston e Ellis (1991).

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Amostras de tumores mamários felinos foram recuperadas dos arquivos do Laboratório Regional de Diagnóstico (LRD) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Estas se encontravam incluídas em blocos de parafina e a partir destas realizaram-se cortes histológicos, os quais foram corados por hematoxilina-eosina (HE). As lâminas histológicas foram avaliadas através de microscopia de luz e classificadas de acordo com o sistema histológico-descritivo, proposto por Misdorp (2002) e apoiado pela OMS/AFIP. Após a classificação histológico-descritiva, foram selecionados os casos de carcinomas e estes foram graduados de acordo com o sistema de Elston & Ellis (1991) (Figura1).

**Figura 1.** Sistema de avaliação do grau histológico em carcinomas mamários (Elston & Ellis, 1991)

<b>Aspecto</b>	<b>Escore</b>
<b>Formação tubular</b>	
Boa formação tubular (+ 75%)	1
Moderada formação tubular (+ 75%)	2
Pouca formação tubular (+ 75%)	3
<b>Pleomorfismo nuclear</b>	
Pequeno, uniforme e regular	1
Moderado aumento de tamanho	2
Marcada variação	3
<b>Contagem mitótica</b>	
0-7	1
8-10	2
+ 17	3
<b>Total</b>	<b>Grau de Malignidade</b>
3-5	I
6-7	II
8-9	III

A contagem de AgNOR foi realizada em cortes histológicos (5 $\mu$ m) corados de acordo com as técnicas preconizadas por Simões et al. (1994), Kravis et al. (1996) e Valdovich et al. (2004)

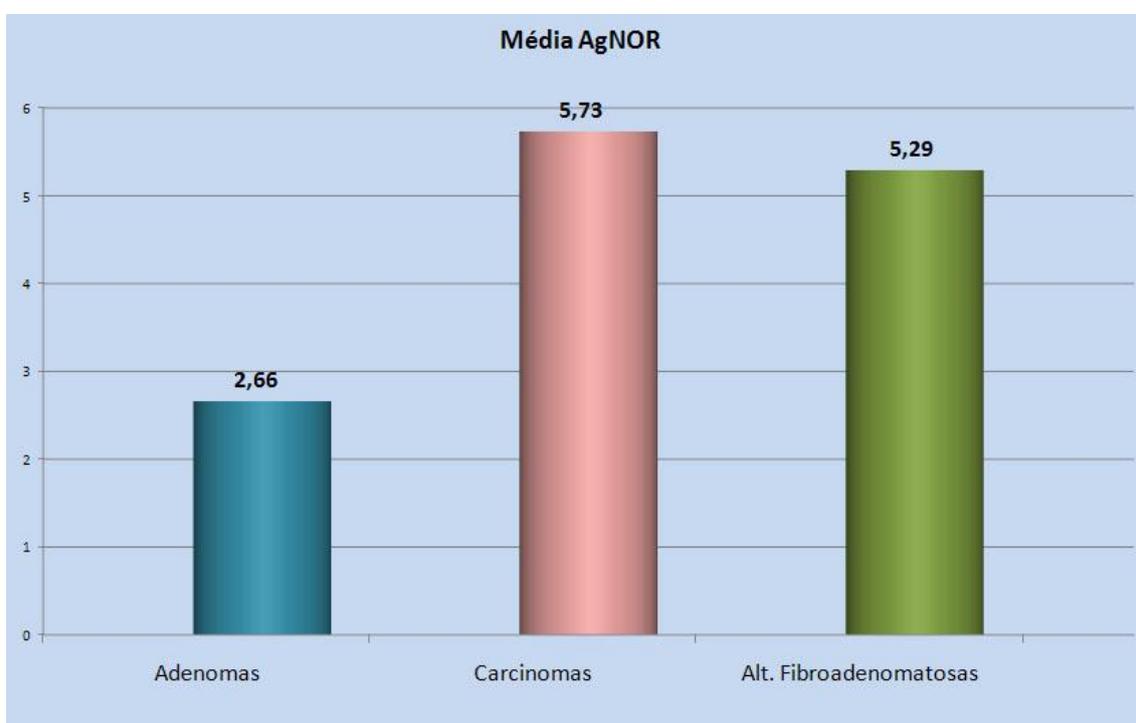
Para determinar a frequência de AgNOR, os grânulos argentafins no interior dos núcleos foram contados através do método de contagem direta à microscopia de luz com objetiva de imersão. Foram selecionados cinco campos representativos e aleatórios em aumento de 1000x, procedendo-se a contagem dos grânulos em 100 células neoplásicas (20 células/campo em 5 campos distintos). A frequência individual de cada neoplasma foi obtida dividindo-se o número total de grânulos contados por 100. A contagem foi realizada por três observadores, em diferentes momentos, sem que nenhum deles tivesse conhecimento prévio do tipo histológico da amostra avaliada ou da contagem do outro observador. Para análise estatística foi utilizado o programa Statistix8 (Statistix 8 Analytical Software, 2008).

## **RESULTADOS**

A partir do levantamento da casuística foram obtidas 55 amostras de tumores mamários, recebidos no período de 1979 a 2007. Obteve-se 12,7% (7/55) amostras de

alterações fibroadenomas, 5,6% (3/55) de adenomas simples 20,0% (11/55) de carcinomas cribriformes, 3,6% (2/55) de carcinomas com diferenciação escamosa, 3,6% (2/55) de carcinomas fusiformes, 1,8% (1/55) de carcinoma mucinoso, 20,0% (11/55) de carcinomas sólidos, 30,9% (17/55) de carcinomas tubulopapilares, 1,8% (1/55) carcinossarcoma.

A contagem de AgNORs/núcleo, dos tumores mamários felinos selecionados, variou de 2,06 a 7,88 com a média geral de 5,34. Os adenomas simples apresentaram uma média 2,66 AgNORs/núcleo, inferior significativamente à média dos carcinomas que obtiveram média de 5,73 AgNORs/núcleo (Figura 2).



**Figura 2** – Média de AgNORs/núcleo das 55 amostras de tumores mamários felinos obtidos dos arquivos do LRD/UFPel no período de 1979 a 2007

Utilizando o método de classificação histológico descritivo, as contagens de AgNORs/núcleo foram distintas para cada subtipo (Tabela 1). Quando foram comparados os índices de AgNOR entre os adenomas e carcinomas esses dados foram estatisticamente significativos ( $P < 0,0075$ ), sendo este índice maior nos carcinomas.

**Tabela 1** - Contagem de AgNORs/núcleo dos 45 carcinomas, de acordo com sua graduação histológica

Grau	Nº casos	Amplitude/AgNOR/ núcleo	Média (Desvio padrão)
I	13	3,23- 5,93	4,07 ( $\pm 0,65$ ) <sup>a</sup>
II	26	2,21- 8,88	5,67 ( $\pm 1,40$ ) <sup>ab</sup>
III	6	6,31- 7,47	6,72 ( $\pm 0,37$ ) <sup>b</sup>
Total	45	2,21- 7,88	5,60 ( $\pm 0,17$ )

Utilizando o método de classificação histológico descritivo, as contagens de AgNOR/núcleo revelaram uma distribuição crescente. Os três adenomas simples mostraram uma amplitude de 2,06 a 3,57 com média de 2,66 AgNOR/núcleo. Os carcinomas simples tubulopapilares variaram de 3,88 a 6,57 (média de 5,2 AgNOR/núcleo). E os 11 carcinomas sólidos apresentaram valores entre 3,23 a 7,64 (média 5,97). O carcinoma mucinoso obteve a menor média (3,81 AgNORs/núcleo), dentre os carcinomas, e o carcinoma cribriforme 4,38 AgNORs/núcleo. Por outro lado, o carcinosarcoma apresentou a maior média de AgNOR/núcleo (7,88).

As contagem de AgNORs foram avaliadas considerando o sistema de graduação histológica. Dos 45 carcinomas, treze (28,9%) foram classificados com grau I, vinte seis (57,8%) classificados com grau II e seis (13,3%) classificados com grau III (Tabela 2). Foram realizadas comparações entre os valores de AgNOR/núcleo através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para amostras independentes. Na avaliação estatística é possível observar que entre os tipos tumorais malignos e benignos os resultados diferiram significativamente entre si ( $p < 0,05$ ). Como fica a “alteração fibroadenomatosa”. Entretanto, quando comparados os subtipos dos carcinomas não houve diferença estatística significativa.

**Tabela 2** - Contagem de AgNORs/núcleo dos 55 tumores de acordo com sua classificação histológica descritiva

<b>Tipo histológico</b>	<b>Nº</b>	<b>Amplitude de AgNOR</b>	<b>Média AgNOR (Desvio Padrão)</b>
<b>Neoplasmas Malignos</b>			
Carcinoma Tubulopapilar	17	3,88-6,57	5,2 ( $\pm 0,81$ ) <sup>a</sup>
Carcinoma Sólido	11	3,23-7,64	5,97 ( $\pm 1,36$ ) <sup>a</sup>
Carcinoma Cribiforme	11	2,21-6,89	4,38 ( $\pm 1,53$ ) <sup>a</sup>
Carcinoma Fusiforme	2	6,31-7,09	6,70 ( $\pm 0,39$ ) <sup>a</sup>
Carcinoma Mucinoso	1	3,81	3,81 ( $\pm 0$ ) <sup>a</sup>
Carcinoma Célula Escamosa	2	5,84-6,50	6,17 ( $\pm 0,33$ ) <sup>a</sup>
Carcinossarcoma	1	7,88	7,88 ( $\pm 0$ ) <sup>a</sup>
<b>Neoplasmas Benignos</b>			
Adenoma Simples	3	2,06-3,57	2,66 ( $\pm 0,65$ ) <sup>b</sup>
Alteração Fibroadenomatosa	7	3,60-6,85	5,29 ( $\pm 1,20$ )
<b>Total</b>	<b>55</b>	<b>5,34</b>	<b>2,06-7,88 (<math>\pm 0,57</math>)</b>

## DISCUSSÃO

Em medicina veterinária vários trabalhos similares com contagem de AgNORs/núcleo foram realizados. Para mastocitomas, Dias (2006) verificou média de 2,8 AgNORs/núcleo e em linfomas Valdovich et al. (2004) encontraram média geral de 2,9 AgNORs/núcleo. Em humanos um estudo realizado com o linfoma não-Hodgkin, demonstrou valores médios de AgNORs/núcleo variando 1,66 a 5,19 (Yazdi & Taghavi, 2005). Mendes (2006), por sua vez, relatou em seu trabalho que em 49 tumores mamários caninos, foi verificada uma média de 2,23 AgNORs/núcleo, com amplitude de 1,39 a 3,2.

No presente trabalho, ao se aplicar a técnica de contagem de AgNORs/núcleo em 55 tumores mamários felinos, obteve-se uma média geral de 5,34 AgNORs/núcleo, com uma amplitude de 2,06 a 7,88. Trata-se de uma média alta, quando comparada com as relatadas por outros autores em diferentes tumores.

Quando a distribuição das AgNORs foi avaliada frente à classificação histológica, foi possível evidenciar que os adenomas simples felinos expressaram valores médios de 2,66 AgNORs/núcleo. Esta foi uma média baixa, especialmente quando comparada com a média nos tumores malignos, que foi de 5,73 AgNORs/núcleo. Bostock, Moriart e Crocker (1992), Destexhe, Vanmanshoven e

Coignoul (1995) em estudo dirigido a tumores mamários caninos, também observaram que a média de contagem AgNORs/núcleo dos grupos de tumores malignos foi maior em relação aos benignos.

Ainda no presente trabalho foram analisados os subtipos dos carcinomas em relação a sua contagem de AgNOR sendo estes comparados entre si. O carcinoma mucinoso obteve de todos os carcinomas avaliados neste estudo menor índice contagem, porém tínhamos apenas um caso. Misdorp, 2002 relata que esse subtipo é muito raro e tem prognóstico favorável a reservado, com baixo índice de recidiva e metástase.

Considerando o carcinoma cribriforme Misdorp (2002) salienta que este é o subtipo mais comum em glândulas mamárias de felinos, sendo altamente invasivo, com prognóstico reservado. Já as amostras incluídas nesse estudo apresentaram a segunda menor média: 4,38 AgNORs/núcleo.

Por outro lado, Benjamin et al. (1999) afirmaram que quando observaram os carcinossarcomas notaram que estes são muito malignos por serem metastáticos e com alto índice de proliferação. Corroborando com estes autores, no presente estudo foi verificado que o carcinossarcoma avaliado apresentou o maior índice de AgNOR/núcleo (7,88) dentre os tumores.

Proteínas AgNORs tendem a estar em maior número em células neoplásicas, indicando que uma maior velocidade de proliferação celular corresponderia a uma maior quantidade de AgNOR (Mendes, 2006). Misdorp (2002) relata que a alteração fibroadenomatosa, lesão exclusiva de felinos (Hayden et al., 1983), é uma condição não neoplásica, e se trata de uma lesão clinicamente benigna considerada um crescimento fibroepitelial o qual é uma forma de displasia mamária. A respeito da alteração fibroadenomatosa percebeu-se neste trabalho que a taxa de 5,29 AgNOR/núcleo foi alta. Vários autores relatam a alta proliferação da alteração fibroadenomatosa (Hayden et al. 1983; Amorim, 2007), o que justifica a alta contagem de AgNOR.

No presente estudo, quando foram comparados os índices de AgNOR entre os adenomas e carcinomas esses dados foram estatisticamente significativos ( $P < 0,0075$ ), sendo este índice maior nos carcinomas. Porém quando foram comparados os diferentes subtipos de carcinomas não foram observadas diferenças estatísticas significativas.

Derenzini (2000) ao analisar a distribuição da contagem de AgNORs/núcleo, considerando o sistema de graduação histológica proposta por Elston & Ellis (1991),

percebeu que o aumento do grau de malignidade era acompanhado pelo crescente aumento do valor médio das AgNORs. Concordando com essa afirmação, no presente estudo foi demonstrado que os carcinomas classificados como de grau I possuíam média 4,07 AgNORs/núcleo, os classificados com grau II apresentaram média de 5,67 e os classificados com grau III, com média 6,72. Este trabalho observou que somente o grau I e grau III diferiam significativamente entre si.

Crocker, Boldy e Egan (1989), entendem que a contagem direta é um método mais acurado e ressaltam que a análise da imagem computadorizada não teria habilidade para considerar AgNORs muito pequenas ou discretas. No presente estudo não foi observada diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre as médias obtidas nos diferentes tipos histológicos quando comparadas entre os três observadores, em acordo com os princípios de Bostock, Moriart e Crocker (1992).

Em veterinária, ainda são poucos os trabalhos publicados em relação ao emprego desta técnica em tumores mamários em felinos, e inúmeros esforços têm sido realizados na padronização da técnica de AgNOR para que sua utilização se torne um parâmetro prognóstico fidedigno (Löhr et al., 1997).

## CONCLUSÃO

Com os dados apresentados neste estudo foi possível concluir que existe correlação entre os índices de AgNOR/núcleo e o potencial de malignidade dos tumores mamários felinos. Observando-se que a média de AgNOR/núcleo tende a elevar-se em tumores que apresentam características histológicas de malignidade. Isto pode ser evidenciado quando comparados especialmente os adenomas e carcinomas. O mesmo foi observado na graduação histológica dos carcinomas mamários, pois os tumores classificados com grau III possuíam altas médias de AgNORs/núcleo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMORIM, F.V. Hiperplasia mamária felina, *Acta Scientiae Veterinariae* v. 35 n.2, p.279-280, 2007.
2. 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.

3. BOSTOCK, D.E.; MORIARTY, J.; CROCKER, J. Correlation between histological diagnosis mean nucleolar organizer region count and prognosis in canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v.29, p.381-385, 1992.
4. CECCARELLI, C.; TRERÈ, D.; SANTINI, D.; TAFFURELLI, M.; CHIECO, P.; DERENZINI, M. AgNORs in breast tumors. **Micron**, v.31, p.143-149, 2000.
5. CROCKER, J. BOLD, D. A., EGAN M. J. How should we count AgNORs Proposals for a standardized approach. **The Journal of Pathology**. v.158, p.185 – 188, 1989.
6. DERENZINI, M. The AgNORs, **Micron** v.31, p.117 – 120, 2000.
7. DESTEXHE; E.; VANMANSHOVEN; P.; COIGNOUL, F. Comparison of argiophilic nucleolar organizer regions by counting and image analysis in canine mammary tumors. **American Journal of Veterinary Research**, v.56, n.2, 1995.
8. DIAS, C.M.F. **Tumores de mama em caninos e felinos: Levantamento de casos e classificação histológica**. 55f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.
9. 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.
10. HAYDEN D.W., JOHNSON K.H. & GHOBRIAL H.K. Ultra structure of feline mammary hypertrophy. **Veterinary Pathology**. V.20: 254-264, 1983.
11. 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.
12. KARAYANNOPOULOU, M.; KALDRYMIDOU, E.; CONSTANTINIDIS, T.C.; DESSIRIS, A. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. **Journal of Comparative Pathology**, v.133, p.246-252, 2005.
13. 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 tumors. **Journal of Clinical Pathology incorporating Molecular Pathology** v. 53, p. 129 – 132, 2000.

14. 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. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 209, p.1418 – 1420, 1996.

15. 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 post fixation and imunohistologic detection of Ki-67 and PCNA. **Veterinary Pathology** v. 34, p.212 – 221, 1997.

16. MENDES, T.C. **Avaliação comparativa de dois sistemas de classificação histológica e da validade da quantificação da AgNOR para adenomas e carcinomas mamários caninos**. 73f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.

17. MISDORP, W. Tumors of the Mammary Gland. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in Domestic Animals**. Iowa: Editor Iowa State Press, 4º ed., 2002, p. 575-606.

18. OSHIMA, C. T. F.; FORONES, N. M. Agnor Em Câncer Gástrico. **Arquivos de Gastroenterologia** v 38 p 89-93, 2001.

19. PEREZ ALENZA, D.; RUTTEMAN, WHITHROW & MACEWEN, G.R.; PEÑA, L.; BEYNEN, A.C.; CUESTA, P. Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case control study. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.12, p.132-139, 1998.

20. 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.

21. 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.

22. YAZDI, I. & TAGHAVI, N. The assessment of AgNORs in grandihg of head and neck non-Hodgkin's lymphoma. **Archives of Iranian Medicine**. v. 8, p.282-285, 2005.

## 5. CONCLUSÕES

Quando utilizamos a graduação histológica, observamos que ela fornece maiores informações sobre o possível comportamento biológico dos neoplasmas. Isto é evidenciado principalmente nos subtipos sólidos e cribiforme, onde eles foram classificados dentro dos três graus, que representa uma grande variação na apresentação histológica.

Com este estudo conclui-se que os dois sistemas de classificação: o sistema histológico descritivo e o sistema de graduação são de grande importância prognóstica e quando usados concomitantemente aumentam a eficácia do diagnóstico.

Com os dados apresentados neste estudo foi possível também concluir que a média de AgNOR/núcleo tende a elevar-se em tumores que apresentam características histológicas de malignidade. Isto pode ser evidenciado quando comparados especialmente os adenomas e carcinomas. O mesmo foi observado na graduação histológica dos carcinomas mamários, pois os tumores classificados com grau III possuíam altas médias de AgNORs/núcleo.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, E.; KOIFMAN, S. 2002. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. **Revista Brasileira de Cancerologia**. 48: 113-31.
- ALLEN, T.C. Hematoxilin and eosin. In: Prophet E.B., Millis B., Arrington J.B., Sobin L.H. (Eds). **Laboratory Methods in Histotechnology** – Armed Forces Institute of Pathology, 1994.: 53-57.
- AMORIM, F.V. Hiperplasia mamária felina, **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 35 n.2, p.279-280, 2007.
- BALDIN, J.C.; FISCHER, I.C.C.; MORAES, J.; GIOPATO, G.; RAMALHO; M.F.P.; CONTIERI, M.B. 2005. Importância do estudo das neoplasias em medicina veterinária: Conceitos atuais. **Anuário da Produção de Iniciação Científica Discente**. Vol. III. No 9. Disponível em: <<http://www.unianhanguera.edu.br/programasinst/Revistas/revistas2006>> Acessado em 2006.
- BELLA, H. J. R. **Tratamento Cirúrgico dos Distúrbios Cutâneos Específicos**. In: Slatter, D. Manual de Cirurgia de Pequenos Animais. 2. ed. São Paulo, Manole, 1998. v. 1. Cap. 29, p. 427 29.
- 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.
- BERTAGNOLI, A.C. **Expressão de p63 e p53 em tumores mamários mistos de cadelas**. 2006. 59f. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- BOSTOCK, D.E.; MORIARTY, J.; CROCKER, J. Correlation between histologic diagnosis mean nucleolar organizer region count and prognosis in canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v.29, p.381-385, 1992.
- CASSALI, G.D. **Estudo morfológico, imuno-histoquímico e citométrico de tumores mamários da cadela, aspectos comparativos com neoplasias da mama humana**. 2000. Belo Horizonte, 80f. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.
- CASTAGNARO, M.; CASALONE, C.; BOZZETTA, E.; MARIA, R.; BIOLATTI, B.; CARAMELLI, M. Tumour Grading and the One-year Post-surgical

- Prognosis in Feline Mammary Carcinomas, *The Journal of Comparative Pathology*. 119, 263-275. 1998.
- CAVALCANTI, M.F.; CASSALI, G.D. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas – revisão. *Clínica Veterinária*, Ano XI, n. 61, março /abril, p. 56-64, 2006.
- CECCARELLI, C.; TRERÈ, D.; SANTINI, D.; TAFFURELLI, M.; CHIECO, P.; DERENZINI, M. AgNORS in breast tumours. *Micron*, v. 31, p.143 - 149, 2000.
- CORMACK, D.H. *Ham/Histologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 570 p.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Neoplasia. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T, eds. **Robbins Pathologic Basis of Diseases**. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1999:260–327.
- CROCKER, J.; BOLD, D.A.; EGAN, M.J. How should we count AgNORS Proposals for a standardized approach. *The Journal of Pathology*. v.158, p.185 – 188, 1989.
- DALTON, L.W.; PAGE, D.L.; DUPONT, W.D. 1994. Histologic grading of breast carcinoma. *Cancer*, 73: 2765-70.
- DERENZINI, M. The AgNORS, *Micron* v.31, p.117 – 120, 2000.
- DESTEXHE, E.; VANMANSHOVEN, P.; COIGNOUL, F. Comparison of argiophilic nucleolar organizer regions by counting and image analysis in canine mammary tumors. *American Journal of Veterinary Research*, v.56, n.2, 1995.
- DIAS, C.M.F. **Tumores de mama em caninos e felinos: Levantamento de casos e classificação histológica**. 2006. 55f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- DOBSON, J.M.; GORMAN, N.T. A clinical approach to the management of skin tumors in the dog and cat. In: *Practice*, 10 p. 55-68, 1988.
- DORN, C.R.; TAYLOR, D.O.N.; SCHNEIDER, R.; HHIBARD, H.H.; KLAUBER, M.R. Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *Journal of the National Cancer Institute*. v.40, p.307-318, 1968.

- DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. **Tratado de Anatomia Veterinária**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 289-91.
- ELSTON, C.W.; ELLIS, I.O. Pathological prognostic factors in breast cancer. 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.
- FONSECA, C.S.; DALECK, C.R. Neoplasias mamárias em cadelas: influência hormonal e efeitos da ovário-histerectomia como terapia adjuvante. **Ciência Rural**, v.30, n.4, p.731-735, 2000.
- HAYDEN, D.W.; JOHNSON, K.H.; GHOBRIAL, H.K. Ultra structure of feline mammary hypertrophy. **Veterinary Pathology**. V.20: 254-264, 1983.
- HEDLUND, C.S. Cirurgia do Sistema Reprodutivo e Genital. In: Fossum, T.W., **Cirurgia dos Pequenos Animais**. São Paulo, Roca, 2002. Cap. 23, p. 596 601.
- HELLMÉN, E.; MOLLER, M.; BLANKENSTEIN, M.A.; ANDERSSON, L.; WESTERMARK, B. Expression of different phenotypes in cell lines from canine mammary spindle-cell tumors and osteosarcomas indicating a pluripotent mammary stem cell origin. **Breast Cancer Research and Treatment**. 61, p. 197–210, 2000.
- HELLMÉN, E.; BERGSTRÖN, R.; HOLMBERG, L.; SPANBERG, 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.
- HOFFMANN., S.G: Receptor blockers - general aspects with respect to their use in domestic animal reproduction. **Animal Reproduction Science**. V. 60, p. 295-312, 2000.
- JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. **Patologia Veterinária**. 6ª ed. Manole. p.880-881. 1997.
- JUNIOR, O.P.C. **Fatores prognósticos clínicos, anatomopatológicos e biomoleculares do câncer de mama estágio clínico II**. 2001. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP- SP.
- KARAYANNOPOULOU, M.; KALDRYMIDOU, E.; CONSTANTINIDIS, T.C.; DESSIRIS, A. Histological grading and prognosis in dogs with mammary

- carcinomas: application of a human grading method. **Journal of Comparative Pathology**, 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 tumors. **Journal of Clinical Pathology incorporating Molecular Pathology**. v. 53, p. 129 – 132, 2000.
- KNUDSEN K.A.; WHEELLOCK, M.J. Cadherins and the mammary gland. **Journal of cellular Biochemistry**, v.95, p.488-496, 2005.
- 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. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 209, p.1418 – 1420, 1996.
- KURZMAN, I.D.; GILBERTSON, S.D. Prognostic factors in canine mammary tumors. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)**, v.1, p.25-32, 1986.
- 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 post fixation and imunohistohistologic detection of Ki-67 and PCNA. **Veterinary Pathology** v. 34, p.212 – 221, 1997.
- MACAW, D.L. Moléstias da Glândula Mamária. In: Bojrab, M, J; Smeak, D.D. **Mecanismos da Moléstia na Cirurgia de Pequenos Animais**. 2. ed. São Paulo, Manole, 1996. cap. 29, p. 216.
- 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.
- MENDES T.C. **Avaliação comparativa de dois sistemas de classificação histológica e da validade da quantificação da AgNOR para adenomas e carcinomas mamários caninos**. 2006. 73f. Pelotas, RS. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.
- MILLANTA F., CALANDRELLA M., CITI S., DELLA SANTA D. & POLI A. Over expression of HER-2 in Feline Invasive Mammary Carcinomas: An

- Immunohistochemical Survey Evaluation of Its Prognostic Potential, *Veterinary Pathology*, 30-34, 2005.
- MISDORP W.; ELSE, R.W.; HELLMÉN, E.; LIPSCOMB T.P. 1999. Histological classification of mammary tumors of the dog and cat. Washington: **Armed Forces of Pathology**, 58p.
- MISDORP, W. Tumors of the Mammary Gland. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in Domestic Animals**. Iowa: Editor Iowa State Press, 4<sup>a</sup> 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, 3<sup>a</sup> ed., 1990, p.518 - 552.
- MULAS, J.M. DE LAS.; MILLÁN, Y.; DIOS, R. A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor  $\alpha$  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.
- NELSON, R.W; COUTO, C.G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1992. cap. 58, p. 685-88.
- OSHIMA, C.T.F.; FORONES, N.M. Agnor Em Câncer Gástrico. **Arquivos de Gastroenterologia** v 38 p 89-93, 2001.
- PATNAIK, A.K.; LIU, S.K.; HURVITZ, A.I.; MCCLELLAND, A.J. Nonhematopoietic neoplasms in cats. **Journal of the National Cancer Institute**, v.54, n.4, p.855-860, 1975.
- PEREZ ALENZA, D.; RUTTEMAN, G.R.; PEÑA, L.; BEYNEN, A.C.; CUESTA, P. Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case control study. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.12, p.132-139, 1998.
- PIEKARZ, H. C. **Expressão da E-caderina no prognóstico de neoplasias mamárias em cadelas**. 2007. Dissertação (mestrado), Universidade Federal do Paraná UFPR- Curitiba.
- QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos factores de prognóstico. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias** v. 97, p.119 – 27, 2002.

- RUTTEMAN, G.R.; WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. W.B. **Small Animal Clinical Oncology**, 3rd edit, Saunders Company, Philadelphia, 2001. p.455-477.
- SAMUELSON, D.A. **Tratado de Histologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.
- SEIXAS, F.; PIRES, M.; LOPES C.A.. Complex carcinomas of the mammary gland in cats: Pathological and immunohistochemical features. **The Veterinary Journal**. 110-116, 2007.
- SHIMIDT, R.E.; LANGHAM, R.F. A survey of feline neoplasms. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.151, n.10, p.1325-1328, 1967.
- SILVA, A.E.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G.D. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio dependentes. **Ciência Rural**, v.34, n.2, 2004.
- 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.
- SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v.33, p.573-596, 2003.
- 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.
- VITASEK, R.; DENDISOVA, H. Treatment of Feline Mammary Fibroepithelial Hyperplasia Following a Single Injection of Proligestone. **Acta Vet. Br.**, 75: 295-297, 2006.
- WITHROW, S.J.; MaCEWEN, E.G. Tumors of the mammary gland. In: **Small Animal Clinical Oncology**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2nd ed., 1996, p.356- 372.
- YAZDI, I.; TAGHAVI, N. The assessment of AgNORs in grandihg of head and neck non-Hodgkin's lymphoma. **Archives of Iranian Medicine** v. 8, p.282-285, 2005.
- ZUCCARI, D.A.P.C.; SANTANA, A.E.; ROCHA, N.S. Correlação entre a citologia aspirativa por agulha fina e a histologia no diagnóstico de tumores

mamários de cadelas. **Braz. J. vet. Res. Anim. Sci.** São Paulo, v. 38, n. 1, p. 38-41, 2001.

## 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 de Metanila

Amarelo de metanila.....1 g

Água desidratada.....100 ml

Ácido acético.....0,25 ml 65

**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 resina 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