

UNIVERSIDADE METROPOLITANA DE SANTOS

ROMULO ELIAS DOS SANTOS FERREIRA

**VALOR PROGNÓSTICO DE TÉCNICA HISTOQUÍMICA DE BAIXO
CUSTO EM TUMORES MAMÁRIOS CANINOS PREVIAMENTE
CLASSIFICADOS POR MEIO DE ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO
COM Ki67**

SANTOS

2019

ROMULO ELIAS DOS SANTOS FERREIRA

Valor prognóstico de técnica histoquímica de baixo custo em tumores mamários caninos previamente classificados por meio de estudo imuno-histoquímico com Ki67

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Medicina Veterinária no Meio Ambiente Litorâneo da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Metropolitana de Santos para a obtenção de título de Mestre em Medicina Veterinária

Área de concentração:
Medicina Veterinária

Orientador:
Prof. Dr. Luiz Roberto Biondi

SANTOS

2019

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FERREIRA, Romulo Elias dos Santos

Título: Valor prognóstico de técnica histoquímica de baixo custo em tumores mamários caninos previamente classificados por meio de estudo imuno-histoquímico com Ki67

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Medicina Veterinária no Meio Ambiente Litorâneo da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Metropolitana de Santos para a obtenção de título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____



UNIVERSIDADE METROPOLITANA DE SANTOS

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

PROTOCOLO CEUA 10217102018

Ilmo. Sr.

Pesquisador Luiz Roberto Biondi

Unidade: Faculdade de Medicina Veterinária

Departamento: Clínica médica

Pesquisador(es) associado(s): Romulo Elias dos Santos Ferreira

Título do projeto: VALOR PROGNÓSTICO DE TÉCNICA HISTOQUÍMICA DE BAIXO CUSTO EM TUMORES MAMÁRIOS CANINOS PREVIAMENTE CLASSIFICADOS POR MEIO DE ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO COM Ki67

**Parecer consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
UNIMES**

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Metropolitana de Santos – CEUA UNIMES em reunião em 18 de outubro de 2018 ANALISOU e APROVOU o protocolo de estudo acima referenciado, uma vez terem sido atendidas as Normas para Utilização de Animais em Procedimentos de Ensino, Projetos de Pesquisa e Extensão – UNIMES.

Caberá, no entanto ao(s) pesquisador(es):

1. Comunicar toda e qualquer alteração no protocolo submetido a esta CEUA.
2. Comunicar a esta Comissão toda e qualquer intercorrência não prevista ou adversa ao protocolo ora submetido.
3. Manter por 05 anos os dados individuais de cada etapa do projeto, uma vez que todo procedimento envolvendo animais é passível de auditoria pelos órgãos competentes.
4. Encaminhar anualmente relatório parcial a esta CEUA, até a finalização do projeto.

Santos, 18 de outubro de 2018



Prof. Dr. Luiz Roberto Biondi

CEUA UNIMES

Presidente

Para contato eletrônico: ceua@unimes.br

Faculdade de Medicina Veterinária
Av. Prof. Dr. Antônio Manoel de Carvalho, 3935 - Nova Cintra – Santos – SP
+55 13 3258 5560 ou 3258 5561

***Aos meus pais, Sarah e Wladilson,
com todo meu amor.***

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço ao meu orientador Dr. Luiz Roberto Biondi, pela ajuda, amizade, paciência e ensinamentos. Por tornar possível este sonho, suas críticas, sempre construtivas, foram fundamentais nesta caminhada. És um exemplo de profissional e ser humano.

Agradeço a todos os professores do colegiado, que contribuíram direta e indiretamente em minha formação, em especial ao professor Milton Ricardo.

À minha família, que sempre colaborou da melhor forma que lhes cabia. Em especial aos meus pais, Sarah e Wladilson Lima, e meus irmãos Artur Lima e Rafael Costa, pela compreensão e ajuda que recebo todos os dias.

Ao amigo Matheus Albuquerque, pelo companheirismo nesta trajetória. À minha namorada Cássia Moura, por toda ajuda e apoio.

A todos, muito obrigado!!

***A força de vontade deve ser mais forte que a habilidade.
(Muhammad Ali)***

RESUMO

FERREIRA, Romulo Elias dos Santos. **Valor prognóstico de técnica histoquímica de baixo custo em tumores mamários caninos previamente classificados por meio de estudo imuno-histoquímico com Ki67.** [Prognostic value of low-cost histochemical technique in canine mammary tumors previously classified by immunohistochemical study with Ki67]. 2019. 47f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Metropolitana de Santos, Santos, 2019.

As Regiões Organizadoras Nucleolares (NORs) são segmentos de DNA que transcrevem o RNA ribossômico e estão localizadas nos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos 13, 14, 15, 21, 22 que, por sua vez, posteriormente é traduzido para proteína, formando os ribossomos. As NORs estão diretamente relacionadas com a síntese protéica e por esse motivo, se encontram aumentadas em número de acordo com o aumento da atividade celular, portanto, diretamente relacionadas diretamente com a atividade proliferativa celular. A técnica de AgNOR (argyrophilic proteins related to nucleolar organizer regions) se baseia na ligação da prata coloidal às proteínas acídicas, não-histonas, associadas às NORs. Este trabalho teve como objetivo comparar o índice de AgNOR de neoplasias mamárias caninas com os resultados obtidos previamente por meio de estudo imuno-histoquímico pela marcação de Ki67 (índice de proliferação) de neoplasias mamárias, a fim de confrontar diferenças e semelhanças e comparar o valor prognóstico de ambas as técnicas. Neste estudo retrospectivo com período de aquisição de 2 anos, foi selecionado material colhido durante procedimento cirúrgico e preservado em parafina, proveniente do serviço de cirurgia do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Metropolitana de Santos – UNIMES. Para a técnica de AgNOR trabalhou-se com duas soluções de preparo de lâminas, que depois de coradas, permaneceram ao abrigo da luz até o momento da microscopia e obtenção de registro fotográfico por meio de programa de aquisição de imagem. Para cada lâmina foram registrados 10 campos de alta magnificação (1000x) sob objetiva de imersão para posterior contagem das regiões de NOR por núcleo. Desta contagem obteve-se um índice médio de AgNOR. Foram realizadas, então, comparações entre os resultados de ambas as técnicas quanto ao grau e tipo

histológico do tumor do tumor, correlação linear entre ambas e estudo de sobrevida. A técnica de AgNOR apresentou-se como método eficaz, de baixo custo e ferramenta prognóstica, tendo demonstrado significância estatística entre o tempo de sobrevida e a positividade para AgNOR.

Palavras-chave: AgNOR, Ki67, histoquímica, imuno-histoquímica

ABSTRACT

FERREIRA, Romulo Elias dos Santos. **Valor prognóstico de técnica histoquímica de baixo custo em tumores mamários caninos previamente classificados por meio de estudo imuno-histoquímico com KI67.** [Prognostic value of low-cost histochemical technique in canine mammary tumors previously classified by immunohistochemical study with KI67]. 2019. 47f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Metropolitana de Santos, Santos, 2019.

Nucleolar Organizing Regions (NORs) are DNA segments that transcribe ribosomal RNA and are in the short arms of acrocentric chromosomes 13, 14, 15, 21, 22 which, in turn, is later translated into protein forming the ribosomes. NORs are directly related to protein synthesis and, therefore, are increased in number as the cell activity increases, and are directly related to cell proliferative activity. The AgNOR (argyrophilic proteins related to nucleolar organizer regions) technique is based on the binding of colloidal silver to nonhistone acidic proteins associated with NORs. This study aimed to compare the AgNOR index of canine mammary neoplasms with the results previously obtained by immunohistochemical study through Ki67 (proliferation index) labeling of canine mammary tumors, in order to compare differences, similarities, and the prognostic value of both techniques. In this retrospective study with an acquisition period of 2 years, material collected during surgery was selected and preserved in paraffin, from the surgical service of the Veterinary Hospital of the School of Veterinary Medicine of Universidade Metropolitana de Santos. In this technique two preparation solutions, one based on colloidal silver, were mixed and applied at each glass slide. Each slide has, then, 10 high-power fields (1000x) images recorded under immersion objective. Comparisons of the two techniques were made regarding the tumor histological type and grade, linear regression and survival comparison. The AgNOR technique was presented as an effective, low-cost method and available prognostic tool, having demonstrated statistical significance between survival time and AgNOR positivity.

Keywords: AgNOR, Ki67, Histochemistry, Immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Registro fotográfico de uma lâmina após padronização da tonalidade – Santos – SP – 2019.....	30
Figura 2 - Registro fotográfico da figura 1 após a contagem de NOR's realizado por meio do programa ImageJ® – Santos – SP – 2019.....	31
Figura 3 - Imagem de uma lâmina pronta para contagem de células – Santos – SP – 2019.....	31
Figura 4 - Imagem de uma lâmina melhorada após processamento com o programa ImageJ – Santos – SP – 2019.....	32
Figura 5 - Imagem após contagem de NOR's, nota-se a grande quantidade de células com a presença de uma única região NOR – Santos – SP – 2019.....	32

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Curva ROC obtida por meio do índice de proliferação individualizado de cada animal – Santos – SP – 2019.....	35
Gráfico 2-	Coeficiente de correlação entre Ki67 e AgNOR, observamos que não houve correlação entre ambos – Santos – SP – 2019.....	36
Gráfico 3 -	Distribuição do Índice de AgNOR de acordo com o estadiamento clínico – Santos – SP – 2019.....	37
Gráfico 4 -	Distribuição do Índice de AgNOR de acordo com o grau histológico do tumor – Santos – SP – 2019.....	37
Gráfico 5 -	Curva de sobrevida em função do estadiamento clínico dos animais – Santos – SP – 2019.....	38
Gráfico 6 -	Curva de sobrevida em função do índice de Ki67 – Santos – SP 2019.....	39
Gráfico 7 -	Curva de sobrevida em função do índice de Ki67 – Santos – SP – 2019.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Distribuição das lesões mamárias epiteliais por tipo e grau histopatológico – São Paulo – 2014.....	34
------------	---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	ELEMENTOS ANATÔMICOS DA MAMA EM CADELAS	17
2.2	TUMORES MAMÁRIOS EM CADELAS	19
2.3	REGIÕES ORGANIZADORAS NUCLEOLARES IMPREGNADAS PELA PRATA – AGNOR.....	21
2.3.1	Da preparação á técnica	23
2.3.2	AgNOR como fator prognóstico	24
2.4	IMUNOHISTOQUÍMICA E MARCADORES TUMORAIS	25
2.4.1	Marcador tumoral Ki67	26
3	METODOLOGIA	27
3.1	COLHEITA DE MATERIAL E DADOS DOS ANIMAIS.....	28
3.2	MARCAÇÃO AGNOR.....	28
3.3	IMUNO-HISTOQUÍMICA	32
4	RESULTADOS	32
4.1	ANÁLISE DESCRITIVA.....	32
4.2	CONTAGEM DAS REGIÕES DE AGNOR.....	33
5	DISCUSSÃO	39
6	CONCLUSÃO	41
	REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de morte em seres humanos e caninos e seu comportamento previsível de malignidade e padrão metastático qualificam a doença neoplásica de ocorrência natural em cães como modelo para o estudo do câncer em seres humanos, de maneira que não seria possível com outros modelos animais (PORRELLO et al., 2006; PINHO et al., 2012). Os cães também estão expostos aos mesmos fatores que afetam a iniciação e progressão do tumor em seres humanos, como idade, hormônios, fatores nutricionais, estado reprodutivo e fatores ambientais (KHANNA et al., 2006; PAOLONI e KHANNA, 2007; UVA et. al., 2009). Além disso, o sequenciamento genético do genoma canino destacou sua estreita relação com o genoma humano (KHANNA et al., 2006; DAGLI ML, 2008; UVA et. al., 2009), apontando o envolvimento dos mesmos oncogenes e vias de sinalização na carcinogênese em ambas espécies (PINHO et al., 2012).

As regiões organizadoras nucleares (NOR) são segmentos de DNA que podem ser coradas com prata coloidal, tornando-se visíveis ao microscópio como pontos negros no núcleo (AgNOR), nos cortes histológicos. Demonstrou-se que o número de AgNOR por célula, tal como a contagem de núcleos em mitose – índice de mitose, se correlaciona com a atividade celular, sendo indicativo do grau de malignidade e uma alternativa de baixo custo comparada a técnicas mais sofisticadas, como a avaliação do índice de proliferação por marcação imuno-histoquímica de Ki67 (BOSTOCK et al., 1989; HOWAT et al., 1989; DE ROSA et al., 1992; WEBSTER et al., 2008; MARINESCU et al., 2016). Em um estudo que investigou o significado do índice mitótico e da contagem de AgNOR em 74 amostras de tumores mamários caninos, o índice mitose e as contagens de AgNOR foram significativamente ($P < 0,05$) diferentes para os tumores mamários benignos e malignos, sugerindo que o índice mitótico e a contagem de AgNOR são bons indicadores de malignidade (KUMAR et al., 2010).

Este trabalho tem como objetivo comparar o índice de AgNOR de neoplasias mamárias caninas com os resultados obtidos previamente por meio de estudo imuno-histoquímico pela marcação de Ki67 (índice de proliferação) destas

neoplasias, a fim de confrontar diferenças e semelhanças e comparar o valor prognóstico de ambas as técnicas.

O respectivo trabalho foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA, da Universidade Metropolitana de Santos sob número de protocolo 10217102018.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ELEMENTOS ANATÔMICOS DA MAMA EM CADELAS

Na glândula mamária, as células secretoras de leite se desenvolvem via proliferação do epitélio nos alvéolos, pequenas cavidades ocas que se organizam em lóbulos (KLEIN, 2014).

As glândulas mamárias provêm do ectoderma embrionário, que é inicialmente representado por espessamentos lineares paralelos, chamados cristas, na superfície anterior do abdome. O conjunto de botões mamários vem interromper a continuidade da crista assim formada. É destes botões que são engendradas as estruturas funcionais da glândula mamária (KLEIN, 2014).

As células secretoras de leite da glândula mamária são denominadas parênquimas e, como dito, decorrem da proliferação de células epiteliais provenientes dos cordões mamários primários. Formam-se, por derradeiro, das células epiteliais, os alvéolos: os elementos circulares e vazios que constituem as unidades secretoras de leite fundamentais da glândula mamária.

A par deste processo, desenvolve-se, na superfície, uma porção significativa de epitélio, o mamilo, que representa a ligação do sistema interno de secreção de leite com o exterior. Nos indivíduos do sexo masculino, os cordões mamários primários não resultam em tecido glandular substancial, a despeito da formação, de modo geral, de mamilos (KLEIN, 2014). De ordinário, as glândulas mamárias encontram-se aos pares, contudo é variável o número de pares nos animais domésticos, de acordo com a espécie.

As glândulas mamárias dos cães são glândulas sudoríparas modificadas, de localização subcutânea, que se localizam no espaço que vai da região inguinal à axilar. As cadelas, de ordinário, possuem cinco pares de glândulas mamárias. O seu posicionamento, em duas linhas paralelas, é indicado pelos mamilos: dois pares torácicos, dois abdominais e um inguinal (EVANS e CHRISTENSEN, 1993; DYCE, SACK, WENSING, 1997; PEREIRA et. al, 2000).

A mama é uma glândula do tipo túbulo alveolar composto, embriologicamente derivada do ectoderma. As mamas surgem como botões epiteliais que brotam do

mesênquima subjacente, a partir da crista mamária, espessamento linear paralelo que cobre a área entre as axilas e as virilhas. Os dutos lactíferos formam-se no fim do desenvolvimento embrionário, com a canalização das projeções epiteliais. Já os botões epiteliais dão origem às células mioepiteliais, alvéolos e dutos pequenos (BANKS, 1991; EVANS e CHRISTENSEN, 1993; DYCE, SACK, WENSING, 1997).

Sob o aspecto macroscópico, a glândula mamária compõe-se de unidades glandulares simétricas, bilaterais e paralelas, dispostas na linha mediana ventral. Sob o ângulo microscópico, trata-se de uma glândula sudorípara exócrina modificada, de tipo tubuloalveolar, especializada na produção e secreção de leite, constituindo-se em caráter distintivo dos mamíferos (GETTY, 2008).

Cada mama consiste em um teto e um corpo que se revestem de tecido epitelial. Os elementos do corpo podem ser visualizados por meio de um corte longitudinal que passe pela papila e pelo próprio corpo. Este elemento é dividido em septos conjuntivos, chamados lobos, que, por sua vez, decompõem-se em lóbulos. A convergência de dutos excretores, que fluem em direção à papila, dá origem aos dutos lactíferos, que finalmente alcançam um espaço de coleta e armazenamento denominado seio lactífero.

O seio constitui-se de uma parte glandular, no corpo, e de uma parte papilar. A parte papilar do seio lactífero liga-se ao exterior através de um estreito canal chamado duto papilar (SAMUELSON, 2007).

Sob o ângulo histológico, as unidades funcionais da glândula mamária são os alvéolos, que se agrupam em lóbulos. A cobertura dos alvéolos e dutos consiste de uma estrutura em camada dupla: uma interna, de epitélio simples cúbico, cuja morfologia celular se modifica de acordo com o estágio de atividade secretora; e uma camada externa, de células mioepiteliais fusiformes, cuja função é contrair-se sob ação da oxitocina, promovendo a expulsão do leite (SAMUELSON, 2007).

Enquanto a drenagem das mamas abdominais caudais e das mamas inguiniais se faz por meio dos linfonodos inguiniais, a drenagem das mamas torácicas se dá através dos linfonodos axilares. Com relação às mamas abdominais craniais, elas são drenadas pelos linfonodos inguiniais, axilares ou ambos (PEREIRA, 2000).

As glândulas mamárias neoplásicas podem apresentar modificações na drenagem que acarretem a propagação de células tumorais para outros órgãos (PEREIRA, 2000).

O provimento sanguíneo das glândulas mamárias se realiza mediante certas artérias, de acordo com sua disposição no ventre do animal. As glândulas torácicas irrigam-se da artéria epigástrica superficial cranial e por ramos das artérias intercostal e torácica lateral. As glândulas abdominais craniais são abastecidas pela artéria epigástrica superficial cranial que se anastomosa com a artéria epigástrica superficial caudal. As glândulas abdominais caudais e as glândulas inguinais irrigam-se da artéria epigástrica superficial caudal. Para essas glândulas, também há fluxo sanguíneo desde outras fontes, como os ramos cutâneos da artéria frênica abdominal e a artéria pudenda externa. Igualmente, a glândula inguinal recebe afluxo de ramos da artéria pudenda externa e de ramos cutâneos da artéria ilíaca circunflexa profunda (SLEECKX et al., 2011).

2.2 TUMORES MAMÁRIOS EM CADELAS

De acordo com os dados publicados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, o Brasil, com 52,2 milhões de cães (1,8 cão por domicílio, em média), é o segundo país com maior número de cães do mundo (CASSALI, 2017).

Entre as neoplasias malignas, o câncer de mama constitui o tipo mais frequente em cadelas. É fato assente na literatura que o câncer mamário é, pelo menos, duas vezes mais comum em cadelas que em mulheres. Consoante Lana, Rutteman e Withrow (2007), estes tumores representam entre 41 a 53% do total de tumores malignos em geral.

Por terem maior volume e, por consequência, maior estímulo hormonal, e ainda estarem mais vulneráveis a traumas, as mamas abdominais caudais e as inguinais são, de ordinário, as mais atingidas por neoplasias (DALECK, 1998). Acresce que, de acordo com Benjamin, Lee e Saunders (1999), 60% das cadelas apresentam mais de uma glândula mamária simultaneamente acometidas, sendo frequente a existência de tipologias histológicas distintas.

Com a transformação do paradigma do atendimento médico de animais de estimação, que não é recente, no qual há exigência crescente, de parte dos proprietários, por uma atenção à saúde de nível elevado, aliada à alta ocorrência

dos tumores mamários em cadelas, a pesquisa neste terreno tem ganhado impulso em relação a outras doenças.

Não restam dúvidas que os aspectos clínicos, epidemiológicos e de comportamento biológico e molecular do câncer de mama em cadelas guardam semelhanças em relação aos presentes nas mulheres. É por esta razão que aqueles animais são considerados excelente modelo comparativo para o conhecimento da origem deste tipo de câncer. Portanto, as pesquisas no campo dos tumores mamários caninos proveem dados valiosos para a oncologia comparada (DALECK; NARDI, 2016).

No Brasil, calcula-se que a ocorrência de tumores malignos em cães ultrapasse 70%, que é maior, portanto, do que a descrita nos Estados Unidos, onde a incidência é de 50%, possivelmente porque, naquele país, é comum a realização de ovário-histerectomia em animais jovens (DALECK, 2016).

Por promoverem consequências iguais às da progesterona endógena sobre as glândulas mamárias, o emprego exógeno de derivados de progesterona — usados para prevenção do cio — pode elevar a incidência de tumores de mama em cadelas (SORENMO, 2003).

Embora se apresentem, de ordinário, como nódulos circunscritos de tamanhos variados, as neoplasias mamárias caninas também podem estar relacionadas a reações inflamatórias e ulcerações. Aproximadamente 90% destas lesões podem ser identificadas no exame clínico (MISDORP et al., 1999), o que demonstra uma vez mais importância de seu emprego na rotina dos consultórios.

É de ressaltar que, quando os tumores são identificados pelo proprietário ou profissional, no momento do exame clínico, a maior parte dos animais com neoplasia mamária é clinicamente saudável (CASSALI et al., 2011).

Os tumores de mama classificam-se como benignos ou malignos. Enquanto os malignos distinguem-se por apresentar crescimento acelerado, frequente ulceração e propagação para os tecidos vizinhos, os tumores benignos apresentam desenvolvimento lento e expansivo, com área circunscrita, sem aderência a tecidos adjacentes. Demais, os benignos têm células bem diferenciadas, próximas do tecido normal e as atipias celulares são raras e discretas (CARVALHO, 2006).

Marcadamente, os tumores malignos têm o potencial de promover neoformação vascular e, enquanto crescem, fomentam esta nova vascularização pela secreção de fatores angiogênicos (LUCENA, 2006).

As neoplasias mamárias nos cães acometem principalmente as fêmeas. Nos indivíduos do sexo masculino, a neoplasia de mama é rara e está associada a disfunções hormonais, como hiperestrogenismo resultante de sertoliomas (PELETEIRO,1994).

O aparecimento da neoplasia mamária em cadelas jovens não é comum e normalmente é benigna. O padrão mais frequente de incidência deste tipo de tumor é em cadelas adultas ou idosas, com mais de seis anos de idade, sendo mais afetados os animais entre dez e onze anos (DORÉ; LANTHIER; SIROIS, 2003)

Malgrado haja estudos que afastem a predisposição racial (DORÉ; LANTHIER; SIROIS, 2003), outros há que apontam maior incidência em cadelas Beagle, Boxer, Cocker Spaniel, Dachshund, Fox Terrier, Pointer e Setter Inglês (MISDORP, 1999; ZATLOUKAL et al., 2005). Em todo caso, a configuração de predisposição racial vê-se embaraçada pela variação das raças com o local e o tempo e a elevada proporção de cães sem raça definida. Todo este cenário torna o estabelecimento de um padrão de raça predispostas um problema complexo (PELETEIRO, 1994).

2.3 REGIÕES ORGANIZADORAS NUCLEOLARES IMPREGNADAS PELA PRATA - AGNOR

As Regiões Organizadoras Nucleolares (NORs) são segmentos de DNA que transcrevem o RNA ribossômico e estão localizadas nos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos 13, 14, 15, 21, 22 que, por sua vez, posteriormente é traduzido para proteína, formando os ribossomos. Os ribossomos, quando ligados ao RNA mensageiro, formam os polirribossomos, que são responsáveis pela síntese de todas as proteínas nos seres humanos, inclusive as proteínas que formarão novas células (JUNQUEIRA, 2008). As NORs estão diretamente relacionadas com a síntese protéica e, por esse motivo, se encontram aumentadas em número de acordo com o aumento da atividade celular e estão relacionadas diretamente com a atividade proliferativa celular (RIVERO, 2002). A técnica de AgNOR (argyrophilic proteins related to nucleolar organizer regions) se baseia na ligação da prata coloidal às proteínas acídicas, não-histônicas, associadas às NORs (KHAN,1993)

As NORs são alças de ácido desoxirribonucléico (DNA) responsáveis por sintetizar ácido ribonucléico ribossomal (RNAr) durante a intérfase, período de síntese protéica e de aumento de volume, tamanho e número de organelas da célula (VANDERLAER; THIRY; GOESSENS, 1999).

O ciclo celular compreende as fases de meiose, interfase e mitose. A duplicação do cromossomo ocorre especificamente na fase de interfase, sendo essa dividida em 3 partes: fase G1 (intensa produção de proteínas e RNA), fase S (síntese do DNA) e fase G2 (período de duplicação de centríolo). As células que param de se replicar encontram-se em fase G0, que acontece imediatamente antes do início da síntese de DNA (MURRAY, 2004). É no nucléolo, localizado no núcleo celular, que há armazenamento e produção de RNAr, que ligados à várias proteínas irão formar os ribossomos (LEE; BENJAMIN; SAUNDERS, 1999).

Proteínas não-histonas possuem sítio de ligação com RNAr (AgNOR) e tem afinidade pela prata e com isso, elas precipitam formando grumos de nucléolo, isolados ou agrupados, que podem ser observados à microscopia óptica (CROCKER; BOLDY; EGAN, 1989). As proteínas mais conhecidas e também as mais presentes (60-75%) em células em proliferação são a C23 (nucleolina) e a B23 (nutramina) (SIRRI; ROUSSEL; HERNANDEZ-VERDUM, 2000).

A coloração das proteínas argirofílicas, presentes nos cromossomos no estadió de interfase, relacionadas às NORs, usada em preparações citológicas ou histológicas para a obtenção da taxa de proliferação celular (CROCKER; BOLDY; EGAN, 1989; LINDNER, 1993) em que, em células normais, as NORs são usualmente organizadas de forma clara em número igual ou maior a um, restritas ao nucléolo, e, em células neoplásicas, as NORs se desagregam do nucléolo e tendem a se dispersar pelo núcleo (OFNER; SCHMID, 1996).

Alguns estudos enfocam o uso da técnica de coloração AgNOR em diversas áreas da ciência, como genética e biologia evolutiva de animais da fauna brasileira, segundo Laguna et al. (2010) e VentuRa et al. (2014), na espécie canina em processos tumorais, relatados por Santos et al. (2011) e degenerativos, conforme Gonçalves et al. (2008), e na avaliação do metabolismo epitelial em pesquisa odontológica em humanos (Cavalli et al., 2014). Em equinos, a caracterização da atividade da proliferação celular em linfócitos foi verificada por meio da técnica de AgNOR no estudo da alteração na metilação do DNA em processos tumorais (WNUK et al., 2014).

As proteínas que são coradas pela prata aparecem ao microscópio como pontos pretos dentro dos nucléolos, que podem ser contados de acordo com o número de pontos por célula diretamente ao microscópio ou avaliados quanto a morfometria em analisador de imagem, sendo esse último um método mais rápido e preciso. A capacidade de corar os NORs pela prata é influenciada por vários fatores, como métodos de fixação e duração da exposição a diferentes temperaturas (TRERÉ, 2000).

Na literatura, tem-se relatado que a quantidade de NORs encontrada nas células é diretamente proporcional à proliferação celular, ou seja, quanto maior a atividade proliferativa da célula, maior é a quantidade de NORs observada (RIVERO, 2002).

2.3.1 Da preparação da técnica

A qualidade da técnica AgNOR é de suma importância, pois a precipitação inespecífica com baixo contraste afetará seriamente a contagem de NOR. Existem diferentes maneiras de trabalhar a técnica, contudo algumas são priorizadas pois obtêm uma melhor qualidade na imagem, possibilitando assim a contagem das NORs mais fidedigna ao valor real.

A técnica preconizada por Vajdovich et al. (2004) é feita com amostras citológicas fixadas com etanol a 70% por 10 minutos. A solução de coloração é preparada fresca a partir de dois componentes: solução de gelatina a 2% e solução de nitrato de prata a 50%. A solução de nitrato de prata é misturada com a mistura contendo gelatina na proporção de 2:1 imediatamente antes da coloração e sob condições de luz ambiente reduzida. Para uma boa qualidade da técnica, é feita a dissolução máxima dos cristais de nitrato de prata. Uma a duas gotas da mistura resultante são colocadas nos esfregaços por 30 minutos no escuro. Após o período de incubação, as lâminas são lavadas em água destilada e depois deixadas secar ao ar.

Já a técnica de Li (1995), as amostras de tecido são fixadas em formaldeído tamponado com fosfato neutro a 4% e processadas rotineiramente em parafina. As seções são cortadas com 3 ou 6 micrômetros de espessura e fixadas em lâminas de

vidro não revestidas, mas completamente limpas e secas em estufa a 60°C por 2 horas. As seções de tecido são desparafinizadas em xileno, reidratadas em uma série de etanóis e enxaguadas abundantemente em várias trocas de água redestilada por pelo menos 10 minutos, e seguidas pelo procedimento de coloração da prata. A solução de prata é preparada como se segue. Solução A: Vários tipos de concentrações de gelatina em 2%, 2,5% ou 4% são dissolvidos em ácido fórmico a 1% ou em tampão de citrato, pH 2,3. Solução B: solução aquosa a 50% de nitrato de prata. As soluções A e B são então misturadas em diferentes proporções de volume e filtradas antes do uso. Como substância coloide protetor são gelatina e sal de carboximetilcelulose. A solução de prata é então colocada em uma câmara úmida (diâmetro 13,5 cm, contendo 50 ml de água). A incubação ocorre em um forno de micro-ondas a 900 Watts por intervalos variados. Após a irradiação, as seções são enxaguadas rapidamente em água destilada e tratadas com tiosulfato de sódio a 5% ou solução de Farmer. As seções são posteriormente enxaguadas em água destilada, desidratadas em concentrações crescentes de etanol, limpas em xileno e montadas com Mountex ou DPX.

Quanto ao método de Simões (1994), os tecidos são corados de acordo com Ploton (1986), posteriormente desparafinizadas em xileno e passadas com etanol 100%. Em seguida corados em uma solução de gelatina a 2% e ácido fórmico a 1% em água ultrapura misturada 1:2 com nitrato de prata a 50%. Os tecidos então são incubados por 20 minutos à temperatura ambiente e protegidos da luz, depois lavados em água ultrapura e colocados em solução de tiosulfato a 5% por 2 x 5 minutos. Os tecidos são lavados novamente com água destilada, desidratados, limpos em xileno e montados em meio sintético.

2.3.2 AgNOR como fator prognóstico

O número de AgNORs é significativamente maior em tumores malignos do que em processos fisiológicos, reativos ou benignos. Demonstrou-se que o número de AgNORs por núcleo pode ser considerado uma das características da proliferação e que as contagens médias de AgNOR são bons indicadores do grau de malignidade, como por exemplo do linfoma não-Hodgkin humano. Além disso, as

contagens de AgNOR também foram indicadores de prognóstico pós-cirúrgico em tumores de mastócitos canino (VAJDOVICH et al. 2004)

No estudo de Vajdovich et al. (2004), onde o mesmo pesquisou o método de AgNOR em cães com linfoma, foram utilizadas amostras colhidas dos linfonodos de cães saudáveis e cães com linfoma e o uso de amostras obtidas por diferentes técnicas (aspiração por agulha fina [PAA], impressão, corte verdadeiro, e execução) e processados de maneira diferente (citológica e histológica) para fornecer uma avaliação numérica precisa das AgNORs, o estudo concluiu que quanto maior a capacidade proliferativa de uma célula, os AgNORs mais difusamente aparecem dentro do núcleo.

Em estudo conduzido por Spader (2009) foi observada correlação entre os índices de AgNOR/núcleo e o potencial de malignidade dos tumores mamários felinos. Observou-se, também, que a média do índice de AgNOR/núcleo tende a elevar-se em tumores que apresentam características histológicas de malignidade.

Segundo Giraldo (2003) a técnica de AgNOR demonstrou-se útil na avaliação da atividade proliferativa de alguns tumores cutâneos de cães. A coloração permite, inclusive, que se estabeleça uma classificação dos mastocitomas.

2.4 IMUNOHISTOQUÍMICA E MARCADORES TUMORAIS

Imunohistoquímica é um método que utiliza reagentes altamente específicos para a demonstração de vários antígenos tissulares ou celulares. Diversos fatores, como a fixação do espécime, a escolha dos anticorpos e a interpretação das lâminas, são extremamente importantes, evidenciando a importância da experiência do laboratório de patologia como parte integrante fundamental da excelência do serviço de Oncologia (SCHMITZ, 2010).

O estudo imunoistoquímico tem desvendado várias características biológicas das neoplasias mamárias caninas, algumas delas associadas ao grau histológico, melhorando significativamente nossa compreensão da doença e se apresentando como ferramenta útil na identificação de tipos moleculares distintos e na determinação do prognóstico (BIONDI, 2014).

Os marcadores tumorais (ou marcadores biológicos) são substâncias presentes no tumor, no sangue ou em outros líquidos biológicos, produzidos primariamente por ele ou, secundariamente pelo paciente, em resposta à presença do tumor. É importante que esta substância possa ser utilizada para diferenciar tecidos normais de neoplásicos e que possa ser caracterizada ou quantificada por procedimentos relativamente práticos (ANDRIOLO, 1996).

A utilização dos marcadores tumorais na avaliação do prognóstico de neoplasias tem crescido muito nos últimos anos. Muitos desses marcadores, os quais foram inicialmente identificados por meio de estudos moleculares ou bioquímicos, podem agora ser localizados em cortes de tecido pelo uso da imunohistoquímica ou da hibridização *in situ*. Incluem-se nesta ampla categoria uma variedade de proteínas, algumas das quais estão associadas aos oncogenes e medidores da atividade proliferativa do tumor (ROSEN, 1997).

2.4.1 Marcador tumoral Ki67

O biomarcador Ki67 é uma proteína nuclear não histona que se encontra presente em todas as fases do ciclo celular exceto G₀, caracterizando-a como marcador de proliferação celular. Sua expressão nas neoplasias mamárias aumenta progressivamente num contínuo, da neoplasia mamária benigna ao câncer de mama invasivo. Em mulheres, seu valor prognóstico independe da idade, comprometimento ganglionar ou estado hormonal e está inversamente relacionado à expressão de receptores de estrógeno (CORONATO et al., 2002; SANTISTEBAN et al., 2009).

Inúmeros estudos tentam mostrar a relação entre o número de células Ki67 positivas e o bom ou mau prognóstico em relação ao câncer de mama. Zuccari et al (2004) apontam o Ki67 como um excelente marcador de proliferação celular no diagnóstico e prognóstico de carcinomas mamários e para a malignidade em tumores mamários em cadelas. Verificou-se que o Ki67 está associado com a proliferação celular, estando a fração de células tumorais positivas ao Ki67 correlacionada com a evolução clínica da doença.

3 METODOLOGIA

3.1 COLHEITA DE MATERIAL E DADOS DOS ANIMAIS

Foram incluídos neste estudo retrospectivo material de arquivo na forma de tecido conservado em blocos de parafina de 59 animais da espécie canina, de sexo feminino, de diferentes idades e raças, oriundas do serviço de atendimento ambulatorial do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Metropolitana de Santos – UNIMES (HOVET UNIMES), com diagnóstico clínico de doença neoplásica mamária e submetidas a tratamento cirúrgico.

Dos prontuários médicos foram obtidas informações quanto ao sexo, raça, peso, idade ao diagnóstico, histórico de castração anterior à doença, exames complementares como hemograma, perfil hepático e renal, eletrocardiograma, ecocardiograma e exame ultrassonográfico abdominal, quando aplicáveis e estudo radiográfico de tórax em três posições (ventro-dorsal e latero-laterais direita e esquerda) para pesquisa de metástase e estadiamento clínico da doença. Para efeito de classificação histológica e gradação tumoral, foram considerados os critérios propostos por Cassali et al. (2011) e Goldschmidt et al., (2011).

Para os estudos de sobrevida, foram considerados os animais com diagnóstico de neoplasia mamária há, pelo menos, 18 meses e seguimento totalizando 40 meses de estudo.

Para fins estatísticos foi considerado o início do período de segmento a data da mastectomia e evento final a morte inequivocamente associada à doença neoplásica maligna, tal como morte por caquexia neoplásica ou eutanásia decorrente a metástase pulmonar ou outra complicação decorrente da doença.

Para os cálculos estatísticos foi utilizado o programa MedCalc software bvba versão 19.13

3.2 MARCAÇÃO DE AgNOR

A metodologia utilizada para a pesquisa em questão foi a priorizada por PLOTON et al, 1986, modificada por Trevisan, M, comunicação pessoal 1996, utilizada pelo Laboratório de Anatomia Patológica da Universidade de Campinas, disponível no sítio <http://anatpat.unicamp.br/>. Para a técnica de AgNOR trabalhou-se com duas soluções. Solução A: que consistiu em solução aquosa de gelatina (solução coloidal) com dissolução de 1 grama de gelatina PA em 100ml de água deionizada à temperatura ambiente. Após homogeneização, adicionou-se 0,25ml de ácido fórmico a 1% em água deionizada (solução fixadora). Originariamente a fórmula determina a utilização de 1 ml de ácido fórmico a 1%, no entanto, testes piloto demonstraram que este volume de ácido fórmico causava corrosão do tecido e, assim, chegou-se ao volume ideal de 0,25 ml. Após o preparo, esta solução foi filtrada com papel filtro e reservada. Solução B: que consistiu em solução aquosa de nitrato de prata diluindo-se 1 grama de cristais de nitrato de prata em 2ml água deionizada. Após o preparo, a solução foi mantida em frasco envolto em papel alumínio para evitar a exposição à luz.

Os fragmentos de tumor montados em lâmina de vidro foram desparafinizados em xilol por 10 minutos e hidratados em sucessivas passagens em álcoois de gradações decrescentes. A seguir, cada lâmina teve seu corte histológico contornado com substância lipídica (manteiga de cacau) a fim de evitar a dispersão do reagente e onde foram, então, depositadas até a total cobertura do tecido e formação de menisco sobrenadante, gotas do corante de AgNOR. Para este fim, o corante foi preparado imediatamente no momento de sua utilização e utilizado na proporção de uma parte da solução A para duas partes da solução B (A:B = 1:2). A seguir, as lâminas foram mantidas em câmara úmida à temperatura ambiente por 30 minutos e ao abrigo da luz.

Após o período de incubação, as lâminas foram enxaguadas em água deionizadas por três passagens de um minuto cada, reveladas em solução de metabissulfito de sódio a 1% por um minuto e meio, enxaguadas em água deionizada por três passagens de um minuto cada, fixadas em solução de tiosulfato de sódio a 2% por um minuto e meio, enxaguadas em água deionizada por três passagens de um minuto cada, desidratadas em sucessivas passagens em

álcoois de álcoois de gradações crescentes, clareadas em xilol, secas ao ar livre e montadas com meio de montagem e lamínula. Depois de coradas as lâminas permaneceram ao abrigo da luz até o momento da microscopia e obtenção de registro fotográfico por meio de software de aquisição de imagem. Para cada lâmina foram registrados 10 campos de alta magnificação (1000x) sob objetiva de imersão.

As imagens, obtidas em tons de cinza, foram normalizadas por meio do programa de análise de imagens Image J®, para padronização da tonalidade do fotomicrografia. Os núcleos das células tumorais foram, então, classificados quanto ao número de regiões de organização nucleolares (NORs – da língua inglesa *nucleolar organization regions*) e cada fragmento tumoral classificado quanto à média de NORs de seus núcleos. As Figuras 1 a 5 ilustram microfotografias obtidas de cortes histológicos corados pela técnica de AgNOR deste experimento e sob a contagem com o programa ImageJ.

Figura 1 - Registro fotográfico de uma lâmina após padronização da tonalidade – Santos – SP – 2019.

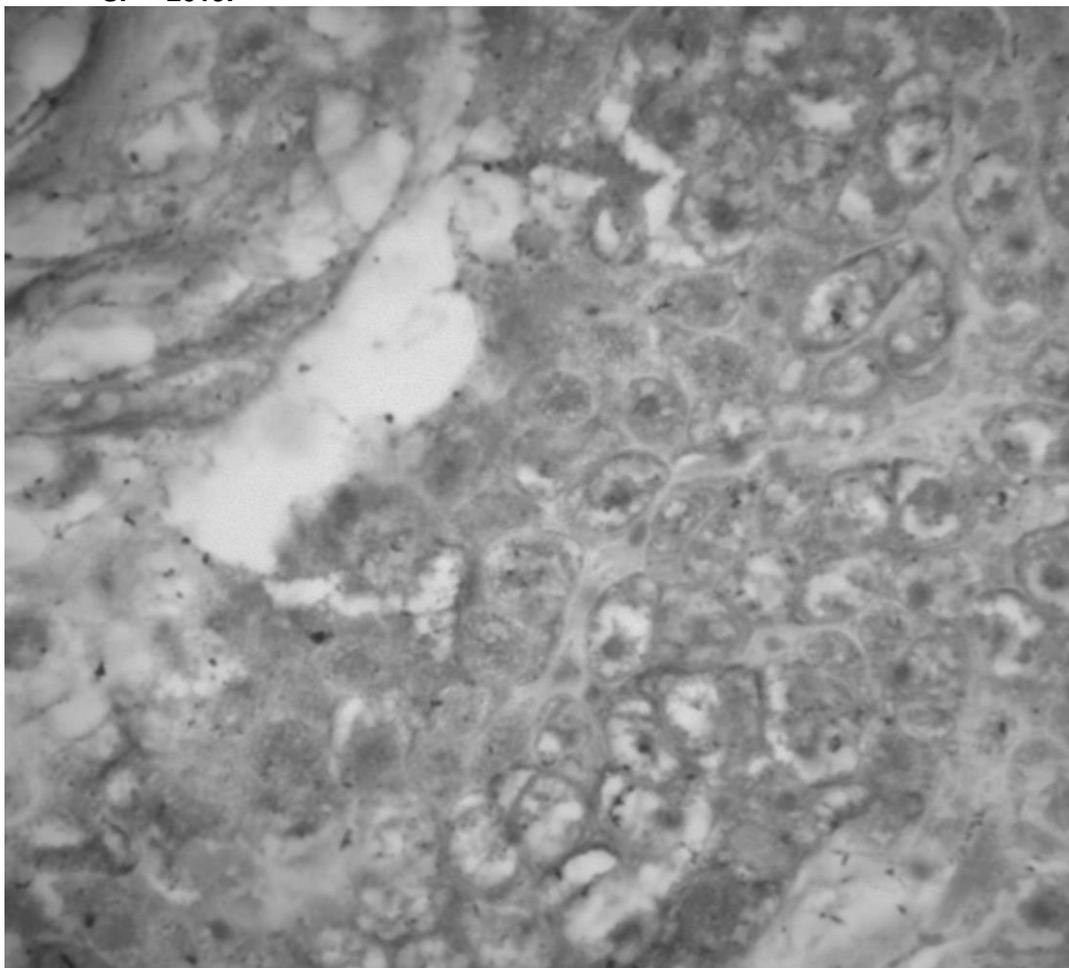


Figura 2 - Registro fotográfico da figura 1 após a contagem de NOR's realizado por meio do programa ImageJ® – Santos – SP – 2019.

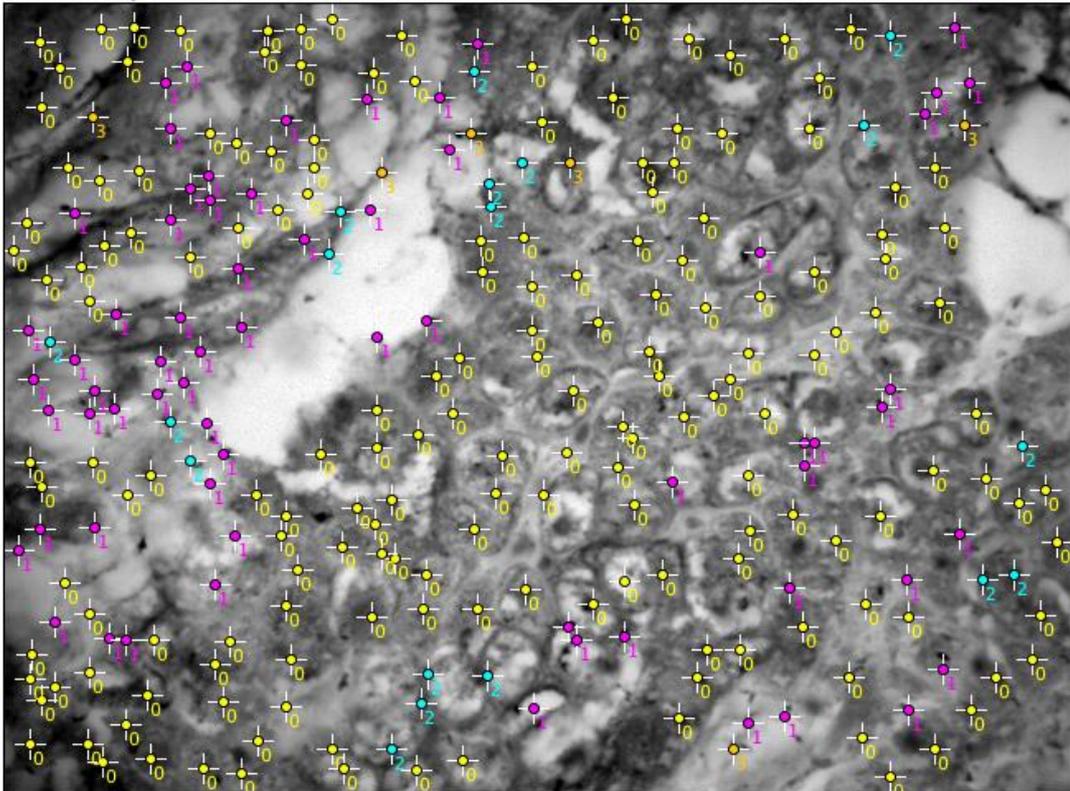


Figura 3 - Imagem de uma lâmina pronta para contagem de células – Santos – SP – 2019.

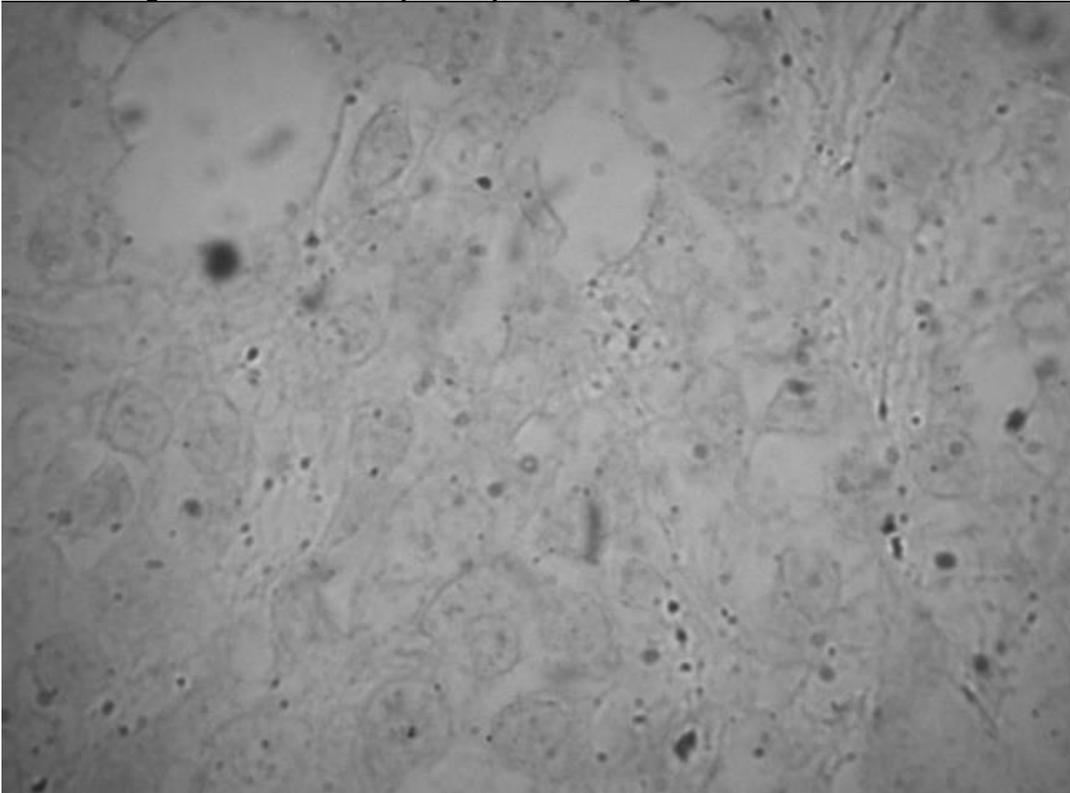


Figura 4 - Imagem de uma lâmina melhorada após processamento com o programa ImageJ - Santos - SP - 2019.

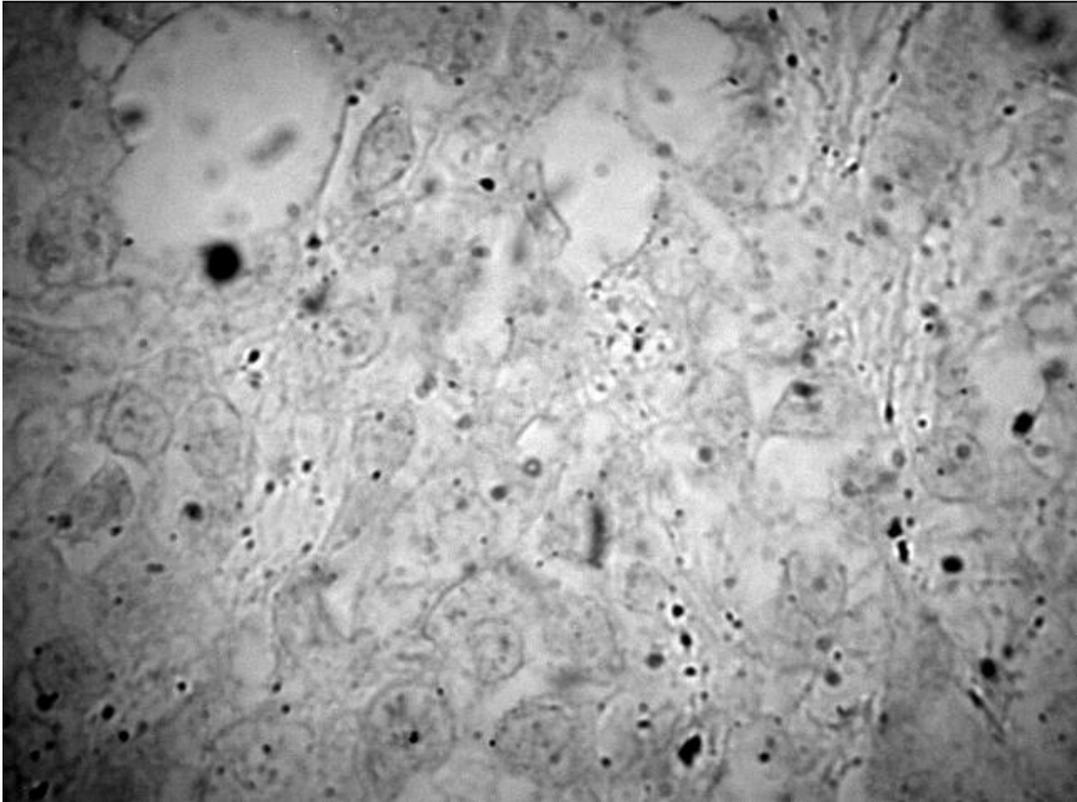
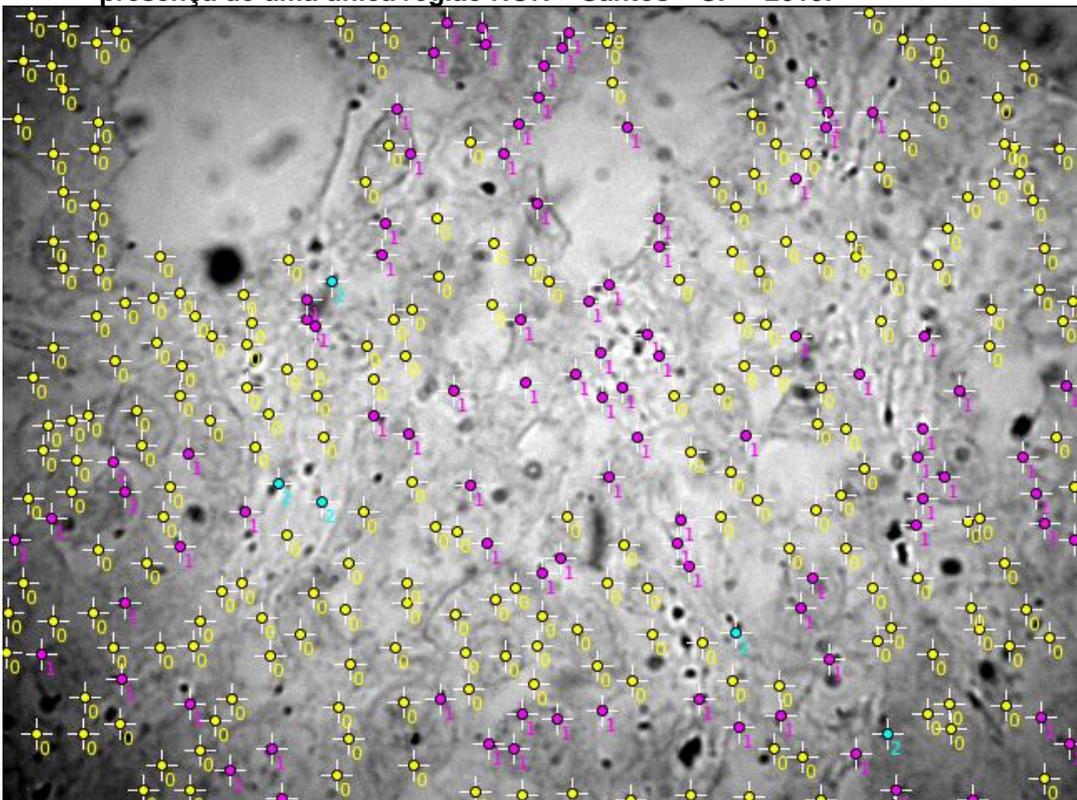


Figura 5 - Imagem após contagem de NOR's, nota-se a grande quantidade de células com a presença de uma única região NOR - Santos - SP - 2019.



3.3 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os experimentos envolvendo os estudos imuno-histoquímicos foram realizados pelo autor Luiz Roberto Biondi e fazem parte integrante de seu trabalho de doutoramento junto ao Programa de Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, cujos resultados parciais foram incorporados a este trabalho (dados disponíveis em <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10133/tde-30062014-084945/pt-br.php>)

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DESCRITIVA

O grupo estudado foi composto por 58 animais da espécie canina, de sexo feminino, com idade mínima ao diagnóstico de 5,1 anos e máxima de 16,0 (média de $10,90 \pm 2,78$ anos) e de diversas raças, não sendo este, objeto deste estudo.

Em relação ao estado reprodutivo, 12 animais (20,33%) possuíam histórico de castração prévia com idade mínima à esterilização de 4,0 anos e máxima de 13,0 anos de vida (média de $7,7 \pm 3,09$ anos), em sua maioria motivada por hiperplasia endometrial cística e piometra. Não houve relato de utilização de hormonioterapia anticoncepcional nas fêmeas incluídas neste estudo.

Segundo informações obtidas dos proprietários, o intervalo entre a percepção das manifestações clínicas da doença mamária e a procura por assistência médica veterinária variou de um mês a 60 meses (média de $1,72 \pm 1,15$ meses).

Clinicamente, quatorze animais apresentaram nódulos mamários em ambas as cadeias. Quando da apresentação em cadeia única, a maior prevalência ocorreu na cadeia mamária direita (38 animais). Em relação ao aspecto clínico dos tumores, o diâmetro médio obtido foi de $5,7 \pm 4,2$ cm (menor tumor medido com 1,0 cm de diâmetro e o maior tumor medido com 20 cm de diâmetro), 13 animais apresentaram tumores aderidos aos tecidos profundos, e 17 deles com tumores ulcerados.

Dos fragmentos utilizados no experimento, cinco tinham classificação histológica compatível com lesão epitelial não-neoplásica (LENN), três com tumores mamários benignos e 50 tumores malignos. A Tabela 1 sumariza a distribuição das lesões mamárias por tipo histológico.

Ao final do experimento, 13 animais tiveram seus óbitos atribuídos à doença neoplásica mamária. Os demais óbitos, animais vivos ou que tiveram seu segmento interrompido foram considerados censurados para efeito estatístico nos cálculos de sobrevida.

Tabela 1 - Distribuição das lesões mamárias epiteliais por tipo e grau histopatológico – Santos-SP – 2019

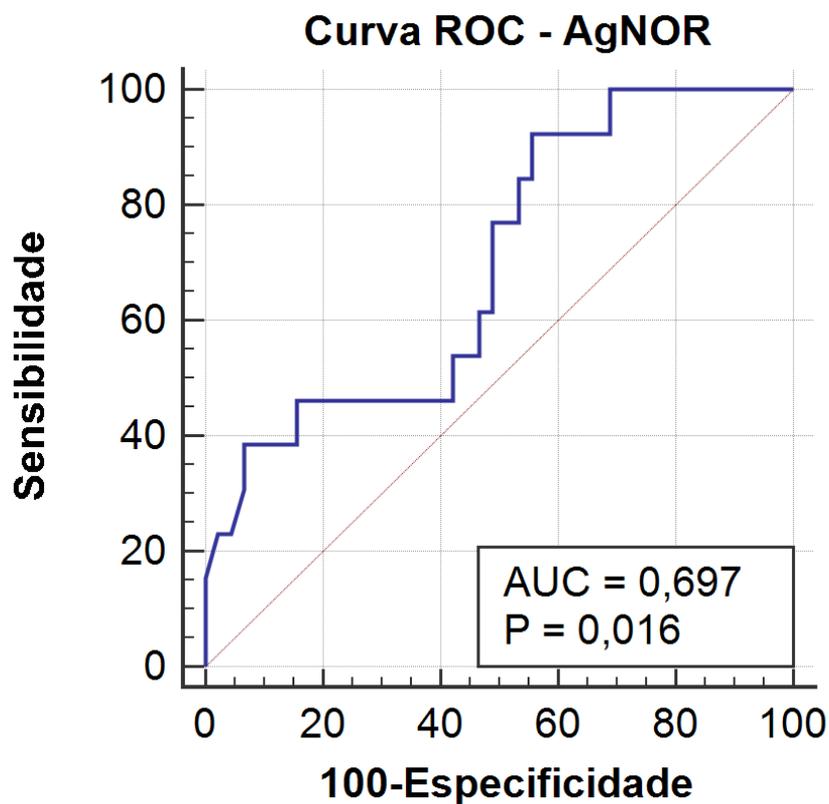
Lesão	Tipo	Quantidade e frequência	Grau		
			I	II	III
Benigna	Adenoma complexo	1
	Tumor misto benigno	2
	Adenose	1
	Hiperplasia tubular	4
	Subtotal	8
Maligna	Carcinoma complexo	8	8	3	..
	Carcinoma em tumor misto benigno	7	7
	Carcinoma inflamatório	1	1
	Carcinoma simples tubular	18	15	3	0
	Carcinoma simples túbulo-papilífero	6	3	3	..
	Carcinoma sólido	6	..	3	3
	Comedocarcinoma	1	3
	Subtotal	50	33	12	7
Total	58	33	12	7	

4.2 Contagem das regiões de AgNOR

Após a realização da contagem das regiões de NOR de cada tumor, foi possível obter-se o índice de proliferação individualizado de cada animal. O referido índice foi, então, submetido ao teste de curva ROC (*Receiver Operator Curve*) com a

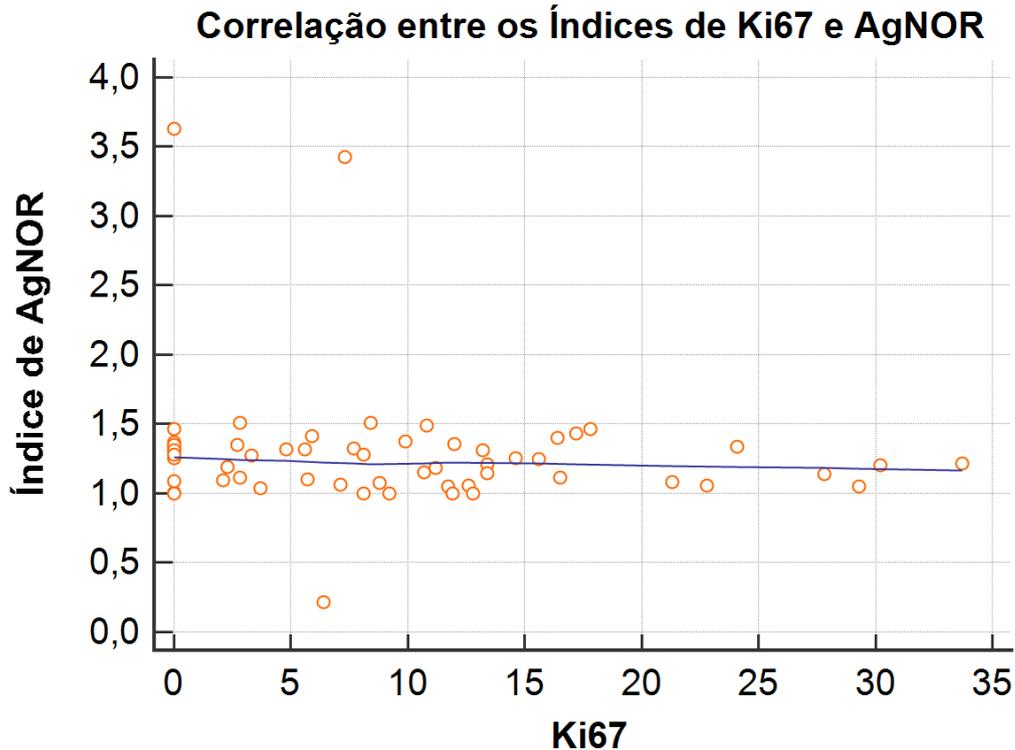
finalidade de se obter linha de corte ou *cut-off* para fins de análise de sobrevida. O gráfico 1 ilustra a curva ROC assim obtida. Índice de corte AgNOR 1,1395 para sensibilidade de 92,31% e Especificidade de 43,24% $p = 0,022$ IC 95%.

Gráfico 1 - Curva ROC obtida por meio do índice de proliferação individualizado de cada animal – Santos – SP – 2019.



Buscando correlacionar o índice de AgNOR com os dados obtidos com a marcação de Ki67, ambos marcadores foram submetidos ao teste de correlação linear de Pearson. Não houve correlação entre os marcadores, com o Coeficiente de Correlação r igual a $-0,1459$ e $p = 0,2745$ para CI de 95%, conforme pode ser observado no Gráfico 2.

Gráfico 2 - Coeficiente de correlação entre Ki67 e AgNOR, observamos que não houve correlação entre ambos – Santos – SP – 2019.



Buscando outras associações, o Índice de AgNOR foi primeiramente submetido ao teste de normalidade de D'Agostino-Pearson e, sendo demonstrada sua distribuição normal, este índice foi submetido a testes paramétricos. Inicialmente, o índice de AgNOR foi agrupado em função do estadiamento clínico dos animais e submetido ao teste de ANOVA não havendo, no entanto, diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,683$ – CI 95%), conforme pode ser observado no Gráfico 3. Os dados foram, também, agrupados em função do grau histológico dos tumores demonstrando, neste caso, diferença estatisticamente significativa entre as médias no teste de ANOVA: Grau 1 média 1,2784 – desvio padrão DP igual a 0,4447; Grau 2 média 1,2412 – DP = 0,3542 e Grau 3 média ,640 – DP = 1,0079 com $p = 0,031$ e CI 95%. O Gráfico 4 sumariza a distribuição do Índice de AgNOR em função do grau histológico do tumor

Gráfico 3 - Distribuição do Índice de AgNOR de acordo com o estadiamento clínico – Santos – SP – 2019.

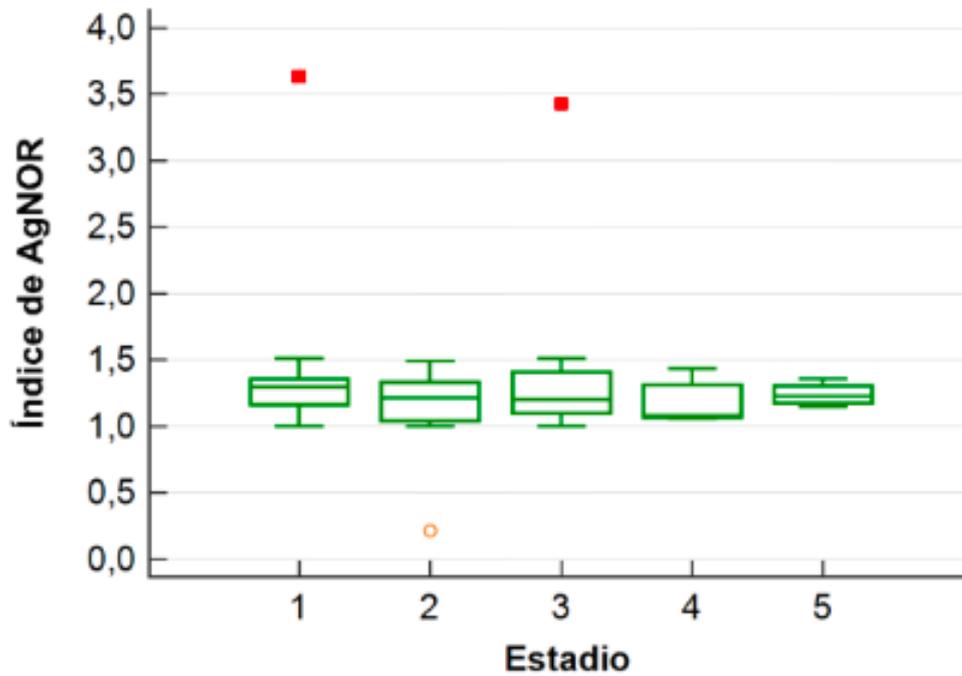
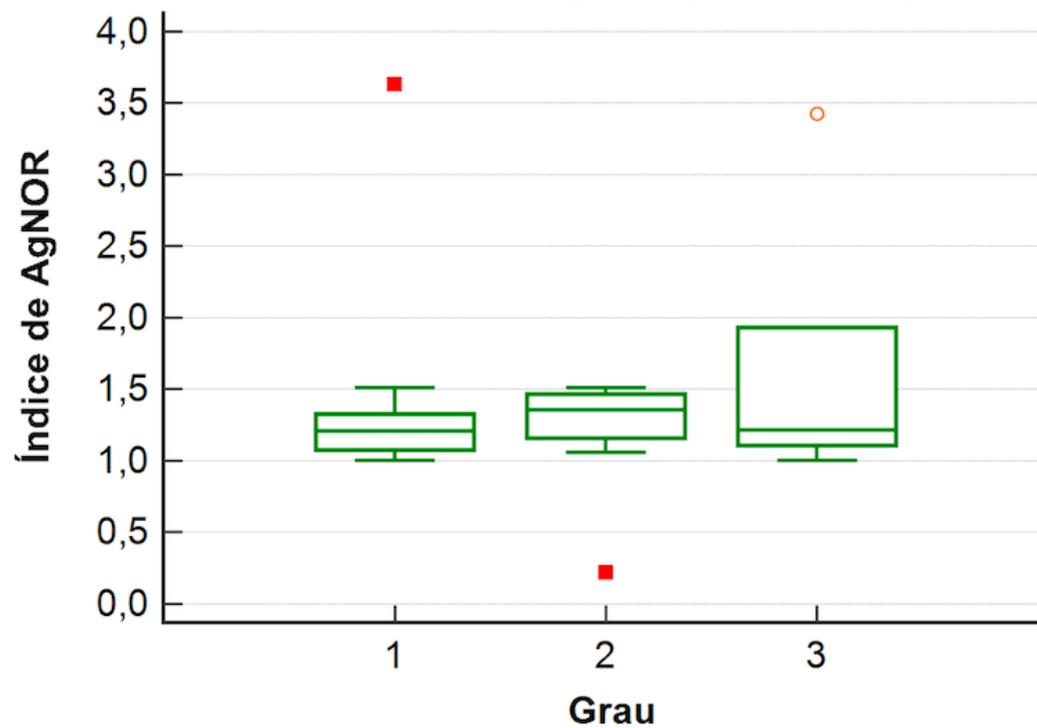


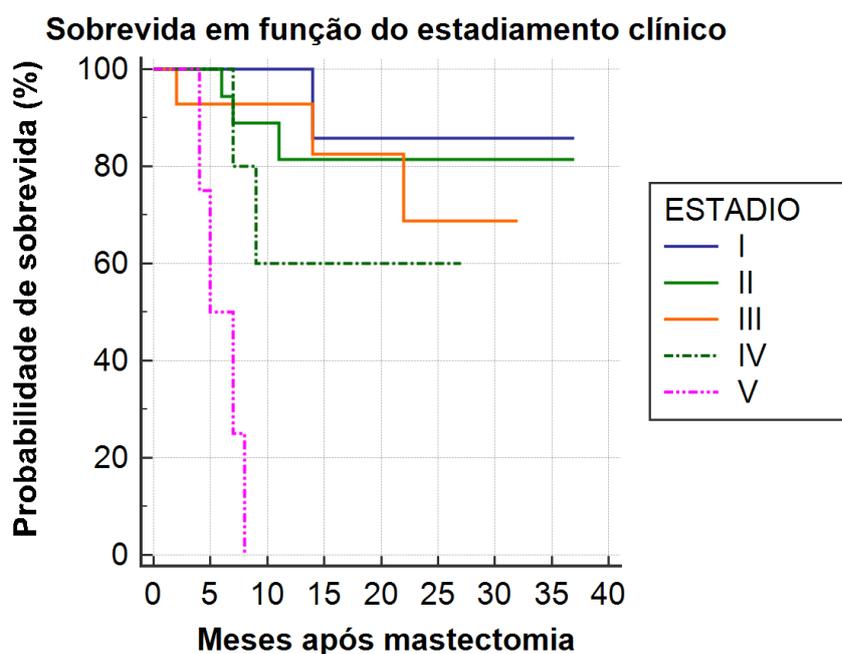
Gráfico 4 - Distribuição do Índice de AgNOR de acordo com o grau histológico do tumor – Santos – SP – 2019.



Finalmente, buscou-se comparar o comportamento de Ki67 e de AgNOR quanto à sua capacidade prognóstica na avaliação da sobrevida. Para isso, aplicou-se o teste de log-rank e curva de Kaplan-Meier em função do estadiamento, do índice de Ki67 e do índice de AgNOR.

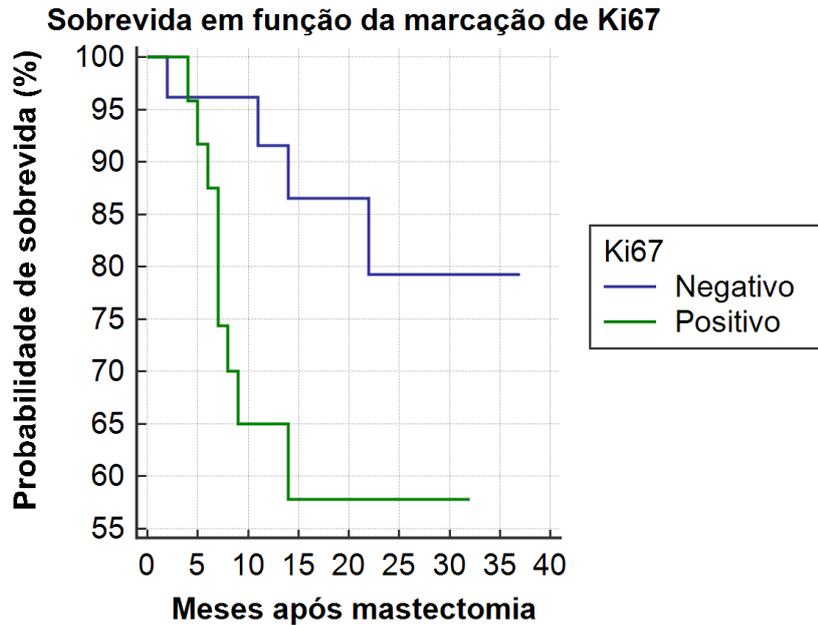
Em relação ao estadiamento, obteve-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos, com $p < 0,0001$ para CI 95% com médias de sobrevida respectivamente: Estadio 1 igual a 33,71 meses; Estadio 2 igual a 31,68 meses; Estadio 3 igual a 26,62 meses; Estadio 4 igual a 19,40 meses e Estadio 5 igual a 6 meses, com média global de sobrevida igual a 28,71 meses. O Gráfico 5 sumariza estes dados.

Gráfico 5 - Curva de sobrevida em função do estadiamento clínico dos animais – Santos – SP – 2019.



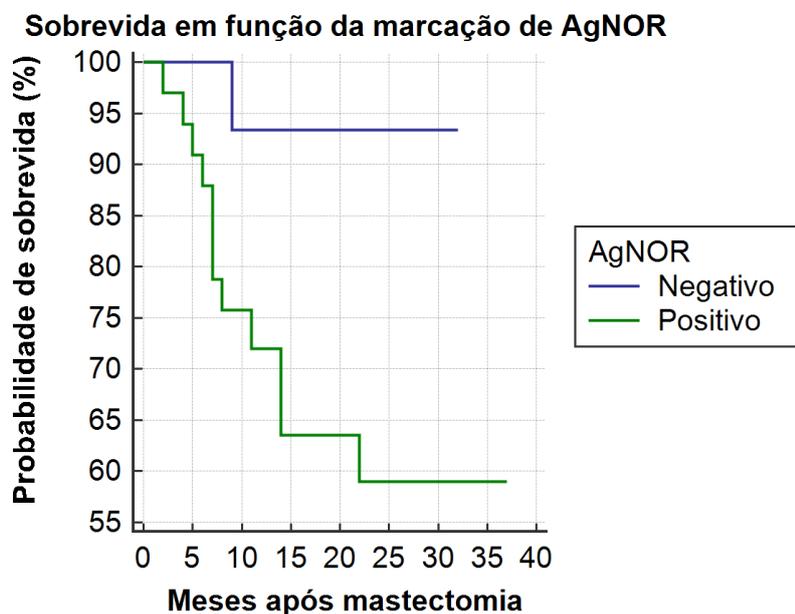
Para Ki67, obteve-se diferença significativa entre os animais positivos para este marcador daqueles negativos (Índice de corte 10%), com $p = 0,0395$ e CI 95% e médias de sobrevida de 33,21 meses para animais negativos e 21,84 meses para animais positivos, conforme pode ser observado no Gráfico 6. Média global de 28,71 meses.

Gráfico 6 - Curva de sobrevida em função do índice de Ki67 – Santos – SP – 2019.



Por fim, em relação ao marcador AgNOR e sobrevida, também obteve-se diferença estatisticamente significativa ($p = 0,034$ CI 95%) entre os animais considerados positivos para este marcador, segundo critério obtido pela curva ROC e o valor de *cut-off*, com média de sobrevida de 30,46 meses para os animais negativos; 25,82 para os animais positivos e 28,71 meses de média de sobrevida global, sumarizado no Gráfico 7.

Gráfico 7 - Curva de sobrevida em função do índice de Ki67 – Santos – SP – 2019.



5 DISCUSSÃO

Este trabalho buscou relacionar duas técnicas voltadas para a avaliação do índice de proliferação celular: uma técnica de baixo custo, valendo-se de histoquímica com impregnação pela prata, AgNOR e uma técnica de alto custo, por imuno-histoquímica utilizando-se de anticorpos anti-Ki6.

Este estudo, utilizando-se de metodologia com curva ROC, obteve índice de corte (*cut-off*) de 1,1395. Embora alguns trabalhos tenham apresentado contagens de AgNOR por núcleo, em geral com média de 2 a 3 NORs, como nos estudos de Vajdovich et al. (2004) que em sua pesquisa fez a contagem da quantidade de NORs em amostras de linfonodos para citologia e histologia de cães saudáveis e em cães com linfoma, verificando média de 2,9 NORs por núcleo enquanto Mendes (2006), que teve como objetivo verificar a correlação entre os índices de AgNOR e o potencial de malignidade dos tumores mamários caninos, obteve média de 2,23 regiões de NORs por núcleo, o presente trabalho obteve valores similares ao observado por Curado, Guerra e Dias (2008), que variam de 1,16 a 2,14 em seu estudo que avaliou a marcação de AgNOR em tecido mamário normal de cadelas que haviam sido ovario-histerectomizadas há pelo menos um ano e tumores benignos e malignos da desta mesma glândula. Por outro lado, Spader (2009), em seu estudo com tumores mamários felinos, obteve média de 5,34, valor este mais elevado se comparado aos demais autores.

Apesar de não ter sido observada correlação entre os marcadores Ki67 e AgNOR, foi possível demonstrar relação entre o grau histológico e a marcação de AgNOR, em especial nos tumores de grau 3, que apresentaram as maiores contagens, à semelhança do que é observado com as marcações com Ki67, que também demonstraram aumento na marcação conforme aumento do grau. No entanto, enquanto com Ki67 se observa aumento da marcação de acordo com o tipo aumento do grau, numa progressão nas marcações, não se observou semelhante comportamento com as contagens de AgNOR, particularmente nos graus 1 e 2. Estes achados vão de encontro aos relatos de Gillespie, Baer e Farrelly (2011), que observou correlação positiva de entre o índice mitótico de AgNOR e Ki67. Segundo este autor, o antígeno Ki67 é expresso por células em proliferação nas fases ativas do ciclo celular (fases G1, G2, M, S) e não é expresso em células inativas (G0). A detecção e quantificação do antígeno Ki67 são, portanto, muito úteis na avaliação de

frações de proliferação ou crescimento de populações celulares. AgNOR são segmentos de DNA que codificam grupos de genes ribossômicos. Essas regiões são mais ativas na fase S e G2 do ciclo celular do que na fase G1, que é característico da divisão rápida das células. O número de regiões ativas e a expressão das proteínas AgNOR são detectadas e quantificadas por manchas de prata. O número de regiões por núcleo está correlacionado com o índice mitótico nas linhas celulares dos tumores e serve como um marcador de tempo de geração. Pelo motivo das marcações entre AgNOR e Ki67 ocorrerem em fases distintas da divisão celular, sendo o Ki67 um marcador com alta especificidade, verificamos que na regressão linear ocorre diferenças entre os marcadores, pois, o incremento de um dos marcadores não necessariamente significará que o outro aumentará, não havendo assim correlação, possuindo valores independentes, contudo com a mesma finalidade e mesmo valor prognóstico. Na opinião deste autor, ambas as técnicas foram eficazes, sendo o AgNOR uma técnica com valor econômico consideravelmente mais baixo.

Quanto ao tipo histológico do tumor, não houve correlação entre as técnicas, pois, o marcador AgNOR marcou indistintamente os diferentes tipos de tumores, sejam eles benignos ou malignos, tais como: carcinoma complexo, carcinoma papilífero, carcinoma sólido, carcinoma tubular, o que se contrapõe ao estudo de Ahmed, Al-Adhrael e Ashankyty (2011) que obteve contagem média de AgNOR significativamente maior entre os tumores malignos em relação aos tumores benignos, bem como diferença entre as marcações de Ki67 e AgNOR.

Neste estudo não houve diferença estatística entre os índices de AgNOR quando agrupados pelos diferentes estádios clínicos. Segundo Daleck e Nardi (2016), o estadiamento é o processo pelo qual se determina a extensão, a disseminação e a gravidade do câncer no corpo de uma pessoa ou de um animal. Reflete a taxa de crescimento da doença e sua relação com o hospedeiro. Neste trabalho utilizou-se o sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos, que classifica os tumores prioritariamente pela extensão anatômica da doença e é baseado na pesquisa de três componentes: T: Extensão/característica do tumor primário; N: Ausência ou presença de metástases em linfonodos regionais; M: Ausência ou presença de metástase a distância. Tipos de estágio: I. Envolvimento limitado a um único ou tecido linfóide em um único órgão; II. Envolvimento de muitos linfonodos em uma região (com ou sem as tonsilas); III. Envolvimento generalizado

de linfonodos; IV. Envolvimento de baço e fígado (com ou sem envolvimento de estágio III); V. Manifestação no sangue ou envolvimento na medula óssea ou em outro órgão sistêmico (com ou sem estágio I a IV da doença). Este achado está em conformidade com Curado, Guerra e Dias (2008), que relatam que vários estudos envolvendo as regiões de NORs tentaram correlacionar informações prognósticas ao estadiamento clínico, porém, sem resultados concretos. Na verdade, segundo estes autores, não apenas o número, mas também a área que as regiões NORs ocupam no núcleo têm um importante papel como fator prognóstico no tempo livre de doença e deveriam ser levadas em conta.

No estudo de sobrevida, a exemplo do marcador Ki67, animais positivos para AgNOR, ou seja, portadores de tumores com índice de proliferação mais alto, possuem prognóstico desfavorável, com média de sobrevida até 5 meses menor que aqueles portadores de tumores negativos. Estes achados estão em concordância com os relatos de Pich, Chiusa e Margaria (2000), que observou que contagens de AgNOR foram inversamente correlacionadas com o tempo de sobrevida no carcinoma de mama, concluindo que a técnica de AgNOR tem importante valor prognóstico para diferentes grupos de risco. No entanto, este mesmo grupo de animais apresentou curva de sobrevida desfavorável em função do estadiamento, o que poderia significar um viés estatístico a ser considerado. Novos estudos, envolvendo um grupo maior de indivíduos se fazem necessários para confirmar os resultados deste trabalho.

6 CONCLUSÃO

A técnica de AgNOR se mostrou de fácil execução e interpretação, apresentando-se como método eficaz e ferramenta prognóstica para sobrevida, tendo sido convalidada por técnica amplamente utilizada e reconhecida por seu valor prognóstico, a imuno-histoquímica com marcação com anticorpos anti-Ki67.

Conclui-se, portanto, por ser tratar de técnica de baixo custo em comparação à técnica de avaliação do índice de Ki67 por imuno-histoquímica, deveria ser considerada como recurso diagnóstico viável financeiramente na avaliação do prognóstico de animais com câncer em regiões menos favorecidas.

REFERÊNCIAS

AHMED, H. G.; AL-ADHRAEI, M. A.; ASHANKYTY, I. M. **Associação entre AgNORs e Expressão imuno-histoquímica de ER, PR, HER2 / neu, e p53 no carcinoma da mama.** Patologia Research International, Volume 2011.

ANDRIOLO, A. **Marcadores tumorais.** Rev Bras Med 1996;53:641-53.

BANKS, W. J. Tecido tegumentar. In: ____ **Histologia Veterinária Aplicada.** 1. ed. São Paulo: Manole, 1991. p. 391-423.

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.

BIONDI, L. R. **Neoplasias mamárias caninas: alterações genéticas e epigenéticas e sua correlação com tipo histológico e prognóstico.** Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de patologia, São Paulo, 2014.

BOSTOCK, D. E.; CROCKER, J.; HARRIS, K.; SMITH, P. **Nucleolar organiser regions as indicators of post-surgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumours.** Br J Cancer [Internet]. 1989 Jun;59(6):915–8.

CARVALHO, T.B. **Neoplasia mamária em cadelas: caracterização histopatológica e expressão de proteínas de estresse (HSP 72).** 2006. 49f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

CASSALI, G. D.; FERREIRA, E.; CAMPOS, C.B. **Patologia mamária canina: do diagnóstico ao tratamento.** São Paulo, SP: Medvet, 2017. 209 p.

CASSALI, G.D. et al. **Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors.** Brazilian Journal of Veterinary Pathology, v. 2, p.153-180, 2011.

CAVALLI, D.; MODOLO, F.; RIVERO, E. R. C. **Avaliação do metabolismo epitelial em cistos radiculares pela técnica de AgNORS.** Rev. Odontol., v.43, p.77-81, 2014.

CORONATO, S.; LAGUENS, G. E.; SPINELLI, O. M.; DI GIROLAMO, W. **Marcadores Tumorales em Cancer de Mama.** Medicina, v. 62, p. 73-82, 2002.

CROCKER, J.; BOLDY, D. A. R.; EGAN, M. J. **How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach.** J. Pathol., v.158, p.185-188, 1989.

CURADO, A. P.; GUERRA, J. L.; DIAS, R. A. **Estudo quantitativo e morfológico das regiões organizadoras de nucléolo coradas pela prata (AgNORs) em neoplasias benignas e malignas da glândula da espécie canina.** Brazilian journal of veterinary research and animal Science, São Paulo, v. 45, n. 3 p. 211-220, 2008.

DAGLI, M. L. Z. **The search for suitable prognostic markers for canine mammary gland tumors: A promising outlook.** *Veterinary Journal*, v. 177, p. 3-5, 2008.

DALECK, C. R. et al. **Aspectos clínico e cirúrgicos do tumor mamário canino: clinical and surgical evolution.** *Cienc. Rural* [online]. 1998, vol.28, n.1, pp.95-100. ISSN 0103-8478.

DALECK, C. R.; NARDI, A. B. **Oncologia em cães e gatos.** 2. ed. Rio de Janeiro : Roca, 2016. 766 p.: il.; 28 cm.

DE ROSA, G.; STAIBANO, S.; BARRA, E.; ZEPPA, P.; SALVATORE, G.; VETRANI A.; PALOMBINI, L. **Nucleolar organizer regions in aggressive and nonaggressive basal cell carcinoma of the skin.** *Cancer*. 1992;69(1):123–6.

DORÉ, M.; LANTHIER, I.; SIROIS, J. **Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors.** *Veterinary Pathology*. Filadelfia, v. 40, n.2, p. 207-212, 2003.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. In: _____. **Tratado de Anatomia Veterinária.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997, 834p.

EVANS, H. E.; CHRISTENSEN, G. C. The reproductive organs. In: MILLER, M. E. **Miller's anatomy of the dog.** 3. ed. Philadelphia: Saunders, 1993. p. 504-558.

GETTY, R. **Anatomia dos animais domésticos.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, v.1, 5 ed., 2048p.

GILLESPIE, V.; BAER, K.; FARRELLY, J. et al. **Canine gastrointestinal stromal tumors: immunohistochemical expression of CD34 and examination of prognostic indicators including proliferation markers Ki67 and AgNOR.** *Vet. Pathol.*, v.48, p.283-291, 2011.

HOWAT, A. J.; GIRI, D. D.; COTTON, D. W. K.; SLATER, D. N. **Nucleolar organizer regions in spitz nevi and malignant melanomas.** *Cancer*. 1989 Feb ;63(3):474–8.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Aparelho reprodutor feminino. In: _____. **Histologia básica.** 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. cap. 22, p. 431-451.

KHAN, M.A. et al. **Comparing flow cytometric analysis and nucleolar organizer region enumeration in archival oral premalignant lesions.** *J. Oral Pathol. Med.*, 22(6): 257-62, 1993.

KHANNA, C.; LINDBLAD-TOH, K.; VAIL, D.; LONDON, C.; BERGMAN, P.; BARBER, L.; BREEN, M.; KITCHELL, B.; MCNEIL, E.; MODIANO, J. F.; NIEMI, S.; COMSTOCK, K.E.; OSTRANDER, E.; WESTMORELAND, S.; WITHROW S. **The dog as a cancer model.** *Nat Biotechnol.* 2006;24:1065–6.

KLEIN, B. G. **Cunningham tratado de fisiologia veterinário.** 5 ed. – Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

KUMAR, P.; KUMAR, R.; PAWAIYA, R. S.; PUTTASWAMY, M. B. **Diagnostic significance of mitotic index and AgNOR count in canine mammary tumours.** Brazilian J Vet Pathol. 2010;3(1):41–5.

LAGUNA, M. M.; AMARO, M. C.; MOTT, T. et al. **Karyological study of *Amphisbaena ridley* (Squamata, Amphisbaenidae), an endemic species of the Archipelago of Fernando de Noronha, Pernambuco, Brazil.** Gen. Molec. Biol., v.33, p.57-61, 2010.

LANA, S.E.; RUTTEMAN, G.R., WITHROW, S.J. Tumors of the mammary gland. In: **Withrow SJ and Vail DM. Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology** 4.ed. St. Louis: Saunders Elsevier. 2007; 619-636.

LEE, A. C.; BENJAMIN, S. A.; 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.

LI, Q.; HACKER, G. W.; DANSCHER, G.; SONNLEITNER-WITTAUER, U.; GRIMELIUS, L. **Argyrophilic nucleolar organizer regions: a revised version of the AgNOR staining technique.** Histochem Cell Biol, 1995 Aug; 104(2): 145-50.

LINDNER, L. E. **Improvements in the Silver-staining Technique for Nucleolar Organizer Regions (AgNOR).** J. Histochem. Cytochem., v.41, n.3, p.439-445, 1993.

LUCENA, C. E. M. **Índice de avaliação ecográfica no estudo dos nódulos sólidos mamários – uma nova proposta de classificação.** 2006. 152f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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.

MARINESCU, A.; STEPAN, A. E.; MARGARITESCU, C.; MARINESCU, A. M.; ZAVOI, R. E.; SIMIONESCU, C. E.; et al. **P53, p16 and Ki67 immunexpression in cutaneous squamous cell carcinoma and its precursor lesions.** Rom J Morphol Embryol. 2016;57(2):691–6.

MISDORP, W.; ELSE R. W.; HELLMÉN, E. et al. **Histological classification of the mammary tumors of the dog and the cat.** In: WORLD Health Organization International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals. 2.ed. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1999. p.16-25.

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.

MURRAY, A. W. **Recycling the cell cycle: cyclings revisited**. Cell., v. 116, p. 221-234, jan. 2004.

OFNER, D.; SCHMID, K. W. **Standardized AgNOR analysis: Its use-fulness in surgical oncology**. Histochem. Cell Biol., v.106, p.193-196, 1996.

PAOLONI, M. C.; KHANNA C. **Comparative Oncology Today**. Vet Clin North Am Small Anim Prat. 2007 Nov; 37(6): 1023–1032; v.

PELETEIRO, M. C. **Tumores mamários na cadela e na gata**. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias, v.89, n.509, p.10-29, 1994.

PEREIRA, C. P. et al. Estudo anatômico comparativo da vascularização linfática mamaria em cadelas sadias e acometidas por neoplasias. **Brazilian Journal of Morphology Science**, v. 17, n. 490, p. 135, 2000.

PICH, A.; CHIUSA., L.; MARGARIA, E. **Prognostic Relevance of AgNORs in Tumor Pathology Micron**, Oxford,2000;v. 31, p. 133-141.

PINHO, S. S.; CARVALHO, S.; CABRAL, J.; GÄRTNER F. **Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis**. Transl Res. 2012;159:165–72.

PLOTON, D. et al. **Improvement in the staining and visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer regions at the optical level**. Histochem. J., 18(1): 5-14, 1986.

PORRELLO, A.; CARDELLI.; P.; SPUGNINI EP. **Oncology of companion animals as a model for humans: an overview of tumor histotypes**. J Exp Clin Cancer Res. 2006 Mar; 25(1):97–106.

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**. J Bras Patol Med Lab. 2002; 38(1):39- 44.

ROSEN, P. P. **Breast Pathology**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997.

SAMUELSON, D. A. **Tratado de Histologia Veterinária**. 1.ed. São Paulo:Elsevier, 2007, p.544.

SANTISTEBAN, M.; REYNOLDS, C.; FRITCHER, E. G. B.; FROST, M. F.; VIERKANT, R. A.; ANDERSON, S. S.; DEGNIM, A. C.; VISSCHER, D. W.; PANKRATZ, V. S.; HARTMANN, L. C. **Ki67: a time-varying biomarker of risk of breast câncer in atypical hyperplasia**. Breast Cancer Research and Treatment, v. 121, n. 2, p.431-437, 2009.

SCHMITZ, A. C.; SILVEIRA, L. V. D. S.; DALAGNOL, R. C.; I-CHING , L. **Papel da imuno-histoquímica no diagnóstico histológico do câncer de pulmão**. Revista Brasileira de oncologia Clínica, Florianópolis, Vol. 77, n 22, 2010.

SCHNEIDER, R. **Comparison of age, sex, and incidence rates in human and canine breast cancer.** Cancer 1970 Aug; 26(2): 419–426.

SCHNEIDER, R.; DORN, C. R.; TAYLOR, D. O. **Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival.** J Natl Cancer Inst. 1969 Dec; 43(6):1249-61.

SILVA, R. D.; DIAS, M. **Incidência do carcinoma basocelular e espinocelular em usuários atendidos em um hospital de câncer.** REFASC - Revista Família, Ciclos Vida e Saúde no Contexto Social (online). 2017; 5(2): 228-234. Available from:.

SIMÕES, J. P.; SCHONING, P.; BUTINE, M. **Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods.** VET PATHOL 31:637–647, 1994.

SIMPSON, R. M.; BASTIAN, B. C.; MICHAEL, H. T.; WEBSTER, J. D.; PRASAD, M. L.; CONWAY, C. M. et al. **Sporadic naturally occurring melanoma in dogs as a preclinical model for human melanoma.** Pigment Cell Melanoma Res. 2014 Jan; 27(1):37–47.

SIRRI, V.; ROUSSEL, P.; HERNANDEZ-VERDUM, D. **The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle.** Micron., v. 31, p. 121-126, 2000.

SLEECKX, N. et al. Canine Mammary Tumours, an Overview. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 1112-1131, 2011.

SORENMO, K. **Canine mammary gland tumors.** The Veterinary Clinics Small Animal Practice, v.33, p.573-596, 2003.

SPADER, M. B. **Fatores prognósticos pela técnica de quantificação das AgNORs em tumores mamários felinos.** Pelotas, 2009.

TREERÈ, D. **AgNOR staining and quantification.** Micron., v. 31, p. 127-131, 2000.

UVA, P.; AURISICCHIO, L.; WATTERS, J.; LOBODA, A.; KULKARNI, A.; CASTLE, J.; PALOMBO, F.; VITI, V.; MESITI, G.; ZAPPULLI, V.; MARCONATO, L.; ABRAMO, F.; CILIBERTO, G.; LAHM, A.; LA MONICA, N.; DE RINALDIS E. **Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors.** BMC Genomics. 2009; 10:1–20.

VAJDOVICH, P.; PSADER, R.; TOTH, Z. A.; PERGE, E. **Use of the argyrophilic nucleolar region method for cytologic and histologic examination of the lymph nodes in dogs.** Vet Pathol. 2004; 41: 338- 345.

VANDERLAER, M.; THIRY, M.; GOESSENS, G.; **AgNOR proteins from orphologically intact isolated nucleoli.** Life Sciences, v. 64, n. 22, p. 2039-2047,. 1999.

VENTURA, K.; MOREIRA, C.N.; MORETTI, R. et al. **The lowest diploid number in Testudines: Banding patterns, telomeric and 45S rDNA FISH in Pellocephalus durelimianus, 2n=26 and FN=52 (Pleurodira, Podocnemididae).** Gen. Molec. Biol., v.37, p.61-63, 2014.

WEBSTER, J. D.; YUZBASIYAN-GURKAN, V.; THAMM, D. H.; HAMILTON, E.; KIUPEL; M. **Evaluation of prognostic markers for canine mast cell tumors treated with vinblastine and prednisone.** BMC Vet Res [Internet]. 2008;4(1):32.

WNUK, M.; LEWINSKA, A.; GURGUL, A. et al. **Changes in DNA methylation patterns and repetitive sequences in blood lymphocytes of aged horses.** AGE. v.36, p.31-48, 2014.

ZATLOUKAL, J. et al. **Breed and Age as Risk Factors for Canine Mammary Tumours.** Acta Veterinaria. Brunensis. v. 74, p.103-109, 2005.

ZUCCARI, D.A.P.C.; PAVAM, M.V.; CORDEIRO, J.A. et al. **A imunoexpressão das citoqueratinas como marcadores diagnósticos e prognósticos nas neoplasias mamárias caninas.** Rev. Port. Cienc. Vet., v.99, p.173-178, 2004.