



## **AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS PROGNÓSTICOS EM TUMORES MISTOS MAMÁRIOS CANINOS**

**GAMBA<sup>1</sup>, Conrado de Oliveira; GUIM<sup>2</sup>, Thomas Normantom; LUCIA Jr<sup>3</sup>, Thomaz; BONEL-RAPOSO<sup>3</sup>, Josiane; GEVEHR<sup>3</sup>, Cristina Fernandes**

<sup>1</sup>:Bolsista PIBIC/CNPq, Departamento de Patologia Animal, Faculdade de Veterinária, UFPel  
[conradogamba@yahoo.com.br](mailto:conradogamba@yahoo.com.br)

<sup>2</sup>Pós-graduando, Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária(PPGV), UFPel

<sup>3</sup>Departamento de Patologia Animal, Faculdade de Veterinária, UFPel

### **INTRODUÇÃO**

A prevalência de câncer em cães vem aumentando consideravelmente, especialmente pela maior longevidade dos animais (De Nardi et al., 2002). Os tumores mamários são os neoplasmas mais comuns em caninos, logo após os tumores de pele (Moulton, 1990; De Nardi et al., 2002; Queiroga & Lopes, 2002; Misdorp, 2002). Nas fêmeas são os mais frequentes (Queiroga & Lopes, 2002).

Entre os diferentes tipos histológicos de neoplasmas mamários observados na cadela, os tumores mistos mamários representam um grupo complexo. A falta de critérios padronizados para classificação morfológica destes tumores gera dificuldade no diagnóstico e no entendimento do seu comportamento biológico, dificultando uma avaliação prognóstica fidedigna (MISDORP, 2002).

Várias tentativas têm sido realizadas para aumentar a eficiência do prognóstico de tumores, e para minimizar a subjetividade das classificações histológicas estabelecidas (Piffko et al., 1997). Há, portanto, uma grande necessidade de se estudar novos marcadores de prognósticos de fácil utilização. Dessa forma, o clínico terá mais segurança na escolha da terapia a ser empregada (Bryne, 1998).

No sentido de qualificar o diagnóstico e prognóstico dos tumores mistos mamários, o presente estudo teve como objetivo: dar continuidade à avaliação do comportamento biológico destes tumores correlacionando o tipo histológico ao período de sobrevivência pós mastectomia dos animais portadores e avaliar a eficiência dos fatores prognósticos existentes.

### **MATERIAL E MÉTODOS**

Para a realização do presente trabalho foram resgatados 43 casos, oriundos de biópsias excisionais ou de necropsias, diagnosticados como tumor misto benigno (TMB), carcinoma em tumor misto (CTMB) ou carcinossarcoma (CCS). Estes casos foram provenientes do Laboratório Regional de Diagnóstico da Universidade Federal de Pelotas (LRD/UFPel). Deste material incluso em parafina foram confeccionadas lâminas histológicas, coradas com hematoxilina-eosina como de rotina, para análise por microscopia óptica de luz.

Os tumores foram classificados de acordo com a descrição histológica para tumores mamários em caninos. Para isso utilizaram-se os critérios histológico-descritivos apresentados por Misdorp (2002) e apoiados pela Organização Mundial de Saúde/Instituto de Patologia das Forças Armadas Americanas (OMS/AFIP), que caracterizam os tumores mistos com a seguinte ordem crescente de malignidade: Tumor misto benigno, carcinoma em tumor misto benigno e carcinosarcoma.

A graduação histológica foi estabelecida de acordo com o sistema proposto por Elston & Ellis (1991). Este sistema considera a formação tubular, o pleomorfismo nuclear e o índice mitótico. A graduação histológica é obtida pelo somatório dos pontos destes três parâmetros, e resulta em neoplasmas que são classificados como de grau I quando os escores resultantes da somatória ficam entre 3 e 5, de grau II quando os escores ficam entre 6 ou 7, e de grau III quando os escores ficam entre 8 ou 9.

A avaliação das regiões organizadoras nucleolares argirofílicas (AgNOR) foi realizada no componente epitelial das amostras de tumores mistos. As amostras foram selecionadas a partir da avaliação dos cortes de hematoxilina-eosina anteriormente citada. A partir do estudo prévio, foram selecionados os blocos de parafina correspondentes, dos quais foram obtidos cortes de 3µm, os quais foram corados através de impregnação pela prata. Para determinar a frequência de AgNOR, os grânulos argentafins no interior dos núcleos foram contados através do método de contagem direta à microscopia óptica. Foram selecionados cinco campos representativos e aleatórios em aumento de 1000x, procedendo-se a contagem dos grânulos em 100 células neoplásicas (20 células cada campo). A frequência individual de cada neoplasma foi obtida dividindo-se o número total de grânulos contados por 100. A contagem foi realizada por dois observadores, em momentos distintos, sem que nenhum deles tivesse conhecimento prévio do tipo histológico da amostra avaliada.

A determinação da taxa mitótica se deu nas lâminas coradas por HE, através da contagem das mitoses em cinco campos aleatórios. Esta contagem foi efetuada através da microscopia óptica de luz em aumento de 40x. Posteriormente, executou-se o somatório das taxas obtidas nos 5 campos e dividiu-se o valor obtido pelo número de campos avaliadas. Isto permitiu a obtenção da média individual de cada tumor avaliado.

A avaliação da invasividade foi realizada no componente epitelial das amostras coradas com hematoxilina-eosina. O método utilizado foi a visualização através da microscopia óptica de luz. Os tumores foram categorizados de acordo com uma escala de invasividade de 0 a 2, representada por 3 categorias: ausência de invasividade (0), invasivo sem ruptura da membrana basal (1) e invasivo com ruptura da membrana basal (2)

A análise estatística foi realizada usando o programa Statisticx (Statistix. 2003. Statistix 8 analytical software. Tallahassee, FL). Foram realizadas comparações entre os fatores prognósticos (graduação, AgNOR, mitose e invasividade) e a classificação histológica dos tumores. Além disso, também se comparou os dois fatores prognósticos indicativos de taxa proliferação (índice mitótico e AgNOR).

Para a comparação entre as classificações histológicas e a taxa mitótica utilizou-se o teste não paramétrico de Krustall-Wallis.

Já na comparação do método de graduação de Elston & Ellis, invasividade e AgNOR com as classificações histológicas utilizou-se o teste Qui-quadrado, Fisher e Tukey, respectivamente. Os valores utilizados para a comparação do AgNOR com a

classificação histológica foram obtidos através da execução das médias entre as contagens de AgNOR/núcleo dos dois observadores.

Para a comparação entre os dois fatores prognósticos avaliadores da taxa de proliferação, AgNOR e mitose, utilizou-se o teste de Spearman.

Na avaliação da sobrevida pós mastectomia dos casos recentes (período de 2007-2008), acompanhou-se 6 animais mastectomizados por no mínimo 4 meses e no máximo 11 meses. As informações foram obtidas por contato telefônico com os proprietários dos animais, utilizando-se um questionário específico para obtenção de informações acerca do estado geral dos pacientes, presença de sinais clínicos e aumento de volume em alguma região corporal. Nos casos de óbito, questionou-se causa ou circunstâncias deste.

## RESULTADOS

O presente trabalho incluía inicialmente 43 amostras. Algumas destas não foram consideradas na avaliação estatística por representarem categorias com número de amostras ainda muito pequeno. Diante disto, os fatores prognósticos foram avaliados em 40 amostras. Deste total, 14(35%) e 26(65%) casos foram classificados como CTMB e CCS, respectivamente. As outras três amostras correspondiam a tumores mistos benignos e 1 delas a um CCS grau III.

Na utilização da classificação de Elston & Ellis (1991) 21 e 19 casos foram classificados como grau I e II, respectivamente. Nos CTMB houve predominância do grau I, porém nos CCS observou-se igualdade entre as duas classificações. Ao efetuar a comparação entre as amostras classificadas como grau I e II, dentro de uma mesma classificação histológica, não foi observada diferença estatística.

Na análise de AgNOR, os CTMB obtiveram uma média de 3,5 e amplitude de 1,8-5,4; já os CCS obtiveram uma média de 3,43 e amplitude de 1,94-6,15. Ao comparar as médias de ambas variantes não se evidenciou diferenças estatísticas.

Ao efetuar a quantificação de mitoses, obteve-se para os CTMB uma mediana de 0,70 e amplitude de 0,2-6 mitoses por campo e para os CCS uma mediana de 0,60 e amplitude de 0-5,4 mitoses por campo. Na comparação entre as classificações histológicas e a taxa mitótica não se obteve diferença estatística entre os CCS e os CTMB.

Na análise da invasividade foram obtidos 10 amostras classificadas como grau 0, 20 com grau 1 e 10 corresponderam ao grau 2. É importante salientar o maior número de amostras classificadas como 0 e 1 nos CCS e como 2 nos CTMB. Na análise comparativa entre as invasividades 0-1, 0-2, e 1-2 não se observou diferença estatística.

Quando se comparou os dois fatores prognósticos de proliferação, mitose e AgNOR, não foi observado diferença estatística. Na avaliação da sobrevida pós-mastectomia todos os casos acompanhados eram carcinossarcomas. Foram obtidos 6 casos, dos quais em 5 (83,33%) os animais permaneceram vivos e em apenas 1 (16,66%) houve morte do animal, porém não relacionada com o tumor.

## DISCUSSÃO

Através da classificação por graduação de Elston & Ellis observou-se uma alta variação entre os dois sub-tipos de neoplasmas avaliados. Isto provavelmente se deve à heterogeneidade dos componentes epiteliais carcinomatosos de uma

mesma amostra (MOULTON, 1990). Isto foi evidenciado ao se encontrar o mesmo número de casos pertencentes ao grau 1 e 2 nos CCS.

Na análise dos fatores de avaliação da taxa de proliferação (AgNORs e mitose) não encontrou-se diferença estatística entre os CTMB e CCS. Assim como no sistema de graduação de Elston e Ellis, isto se deu provavelmente devido a existência de vários padrões de proliferação que determinam a heterogeneidade dos componentes epiteliais. No presente trabalho não foi observada uma relação entre a atividade mitótica e a quantificação de AgNOR, assim divergindo para a descrição de BARWIJUK-MACHATA (2004) e LÖHR (1997). Estes utilizaram outros parâmetros de avaliação que incluem a expressão de PCNA e Ki-67, para definir uma estreita relação AgNOR/mitose.

Após a análise de invasividade das amostras não observou-se diferenças estatísticas significativas em decorrência do número escasso de amostras. Provavelmente se houvesse um maior número das mesmas, seria evidenciado diferenças estatísticas entre elas. Além disso, os CCS obtiveram uma maior taxa dos baixos graus de invasividade (0 e 1), assim corroborando com a heterogeneidade anteriormente citada do componente carcinomatoso presente nos tumores mistos benignos.

## CONCLUSÃO

Diante disso, conclui-se que o sistema de graduação de Elston & Ellis é o mais fidedigno para definir o comportamento biológico dos tumores mistos mamários. Estes são ainda dados preliminares. Deve-se considerar a necessidade do aumento do número de amostras de cada categoria.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARWIJUK-MACHATA, M.; MUSIATOWICZ, B.; CYLWIK, J.; RESZEC, J.; AUGUSTYNOWICZ, A. AgNOR, Ki-67 and PCNA expression in fibroepithelial tumors of the breast in correlation with morphological features. **Folia Morphol.**, 2004, v.63, n.1,p.133-135.
- DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; SOUSA, R. S.; COSTA, T. A.; MACEDO, T. R.; RODIGHIERI, S. M.; RIOS, A.; PIEKARZ, C. H. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, 2002, v. 7, p.15 – 26.
- 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 longterm follow-up. **Histopathology**, 1991, v.19, p.403-410.
- LÖHR, C.V.; TEIFKE, J.P.; FAILING, K.; WEISS, E. Characterization of the proliferation state in canine mammary tumors by the standardized AgNOR method with postfixation and immunohistologic detection of Ki-67 and PCNA. **Veterinary Pathology**, 1997, v.34, p.212-22.
- MISDORP, W. Tumors of the Mammary Gland. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in Domestic Animals**. Iowa: Editora Iowa State Press, 2002, 4ª ed., p. 575 - 606.
- MOULTON, J. E. Tumors of the mammary gland. In: MOULTON, J.E. **Tumors in domestic animals**. Berkley: University of California, 1990, 3ª ed., p.518 - 552.
- QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos factores de prognóstico. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. 2002, v.97, p.2119-2127.

Instituto de Patologia das Forças Armadas Americanas. Disponível em <[www.afip.org/vetpath/who/whomamm.htm](http://www.afip.org/vetpath/who/whomamm.htm)> Acesso em 22 de maio de 2005.

PIFFKÖ, J.; BÄNKFALVI, A.; OFNER D.; BRYNE M.; RASCH D.; JOOS U.; BÖCKER, W.; SCHMID K.W. Prognostic value of histobiological factors (malignancy grading and AgNOR content) assessed at the invasive tumour front of oral squamous cell carcinomas. **British journal of cancer**, 1997, v. 75, p.1543-1546.

BRYNE, M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? **Oral Diseases**, Houndmills, 1998, v. 4, p. 70-77.