

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Dener Barros Moraes

**AVALIAÇÃO DE ÍNDICE PROLIFERATIVO EM AMOSTRAS  
CITOPATOLÓGICAS DE TUMORES MAMÁRIOS CANINOS: CORRELAÇÃO  
HISTOPATOLÓGICA**

Santa Maria, RS

2021

**Dener Barros Morais**

**Avaliação de índice proliferativo em amostras citopatológicas de tumores mamários  
caninos: correlação histopatológica**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Patologia e Patologia Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito para a obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cinthia Melazzo de Andrade

Santa Maria, RS  
2021

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Morais, Dener

Avaliação de índice proliferativo em amostras citopatológicas de tumores mamários caninos: correlação histopatológica / Dener Moraes.- 2021.

49/50 p.; 30 cm

Orientadora: Cinthia Melazzo de Andrade

Coorientadora: Alexandre Krause

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2021

1. Cadelas 2. Citopatologia 3. Histopatologia 4. Neoplasma I. Melazzo de Andrade, Cinthia II. Krause, Alexandre III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, DENER MORAIS, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais

**Dener Barros Morais**

**AVALIAÇÃO DE ÍNDICE PROLIFERATIVO EM AMOSTRAS  
CITOPATOLÓGICAS DE TUMORES MAMÁRIOS CANINOS: CORRELAÇÃO  
HISTOPATOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Patologia e Patologia Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária.**

**Aprovado em 2 de agosto de 2021:**

---

**Cynthia Melazzo de Andrade, Dra. (UFSM)**  
**(Presidente/Orientadora)**

---

**Andressa Bueno, Dra. (UFSM)**

---

**Marcia Cristina da Silva, Dra. (QUALEM – Laboratório Veterinário)**

Santa Maria, RS.  
2021

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai Ailton Camilo de Moraes e a minha mãe Iracema Lídia de Barros Moraes.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por me dar forças pra chegar até aqui e não desistir das coisas que eu tanto quis.

Aos meus pais que mesmo não compreendendo a maioria dos meus planos, sempre me apoiaram em tudo e não mediram esforços para que eu alcançasse meus objetivos.

Agradeço aos meus amigos Ana Martiele, Bernardo Rodrigues, Nathália Barbosa, Renata Bonamigo e Daniele Rodrigues que tanto me ajudaram quando eu mais precisei, que dividiram comigo os melhores e piores momentos durante a pós-graduação. Obrigado pelos sorrisos, pelos abraços, pelas conversas. Sou muito grato por ter amigos como vocês.

Aos amigos do LacVet, aos estagiários que passaram pelo laboratório, que eu pude ajudar e também que me ajudaram muitas vezes com meu experimento.

À minha orientadora Cinthia Melazzo, por toda ajuda, paciência, incentivo e por compartilhar seus conhecimentos durante esses dois anos.

Ao Programa de Pós-Graduação e a CAPES pela ajuda financeira.

Serei eternamente a cada um de vocês!!!

## RESUMO

# AVALIAÇÃO DE ÍNDICE PROLIFERATIVO EM AMOSTRAS CITOPATOLÓGICAS DE TUMORES MAMÁRIOS CANINOS: CORRELAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

AUTOR: Dener Barros Morais

ORIENTADOR: Dra. Cinthia Melazzo de Andrade

A glândula mamária é uma glândula sudorípara apócrina modificada que está presente há milhões de anos nos mamíferos. Está sujeita ao desenvolvimento de tumores e, embora a etiologia não seja muito clara, diversos fatores estão associados ao seu desenvolvimento como hormônios, nutrição, idade e raça. As neoplasias estão entre as principais doenças que acometem diretamente as glândulas mamárias de cadelas. Por conseguinte, observou-se a necessidade de utilizar marcadores prognósticos para identificar o índice proliferativo desses tumores, como exemplo as regiões organizadoras nucleolares argirofílicas (AgNOR), com o propósito de auxiliar na instituição de um protocolo terapêutico adequado. Este estudo objetivou avaliar o índice proliferativo em amostras citopatológicas de tumores mamários caninos correlacionando com a histopatologia. As amostras coletadas pela citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) foram analisadas no Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias da Universidade Federal de Santa Maria, e o exame histopatológico foi realizado pelo Laboratório de Patologia Veterinária da mesma instituição. Os dados foram obtidos a partir da análise utilizando software de computador (IBM SPSS Statistics 23). Os valores de contagem AgNOR das amostras citológicas foram correlacionados com os laudos histopatológicos por um teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e foi feito também a comparação entre os índices AgNOR de dois avaliadores por meio do teste de Wilcoxon para análise dos dados. Não houve diferença nas médias dos índices AgNOR dos diferentes tipos histológicos de tumores mamários para nenhum dos avaliadores ( $p > 0,05$ ). Em adição, a comparação entre a contagem dos dois avaliadores mostrou diferença significativa ( $p < 0,05$ ). Concluiu-se que é necessário que outros estudos sejam realizados com um número de amostras maior e também outros marcadores prognósticos que validem e complementem a técnica de AgNOR.

**Palavras-chave:** Cadelas. Citopatologia. Histopatologia. Neoplasma.

## **ABSTRACT**

### **EVALUATION OF PROLIFERATIVE INDEX IN CYTOPATHOLOGICAL SAMPLES OF CANINE BREAST TUMORS: HISTOPATHOLOGICAL CORRELATION**

**AUTHOR:** Dener Barros Morais

**ADVISOR:** Dra. Cinthia Melazzo de Andrade

The mammary gland is a modified apocrine sweat gland that has been observed in mammals for millions of years. It is subject to the development of tumors and, although the etiology is not very clear, several factors are associated with its development, such as hormones, nutrition, age and race. Neoplasms are among the main diseases that directly affect the mammary glands of bitches. Therefore, there was a need to use prognostic markers to identify the proliferative index of these tumors, such as argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNOR), with the aim of helping to establish an adequate therapeutic protocol. This study aimed to investigate whether there is an agreement between the cytopathological evaluation by the tumor proliferative index, through the AgNOR technique, and the histopathological examination of mammary neoplasms in bitches. The samples collected by fine needle aspiration cytology (FNAC) were analyzed at the Laboratory of Veterinary Clinical Analysis of the Federal University of Santa Maria, and the histopathological examination was performed by the Laboratory of Veterinary Pathology within the same institution. Data were obtained from the analysis using computer software (IBM SPSS Statistics 23). The AgNOR count values of the cytological samples were correlated with the histopathological reports by a non-parametric Kruskal-Wallis test and the comparison between the AgNORs indices of two evaluators was also made using the Wilcoxon test for data analysis. It is considered that there were no differences in the mean AgNOR indexes of the different histological types of breast tumors for any of the evaluators, while the calculated p was greater than 0.05 and the comparison between the counts of the two evaluators showed that there was a difference because the p value was less than 0.05. We were able to conclude that further studies are needed with a larger number of samples and other prognostic markers that may help us to validate and complement the AgNOR technique.

**Keywords:** Bitches. Cytopathology. Histopathology. Neoplasm.



## LISTA DE TABELAS

### INTRODUÇÃO

**Tabela 1** - Classificação histológica dos tumores mamários caninos.....15

### MANUSCRITO

**Tabela 1** - Diagnóstico histopatológico de 31 tumores mamários caninos .....37

**Tabela 2** – Índices AgNOR em amostras citopatológicas de neoplasias malignas, benignas e hiperplasias de 31 tumores mamários caninos.....38

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

**Figura 1** - Aspectos histológicos da glândula mamária.....12

### MANUSCRITO

**Figura 1** – Aspecto microscópico das AgNORs em amostra citológica de tumor de mama (1000x).....36

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGNOR	Regiões Organizadoras Nucleolares Argirofílicas
CAAF	Citologia Aspirativa por Agulha Fina
COX-2	Ciclooxigenase-2
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ER	Receptor de Estrógeno
GH	Hormônio do Crescimento
HVU	Hospital Veterinário Universitário
LACVET	Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias
PCNA	Antígeno Nuclear de Células em Proliferação
PR	Receptor de Progesterona
PRL	Prolactina
TGF	Fator de Crescimento Tumoral
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
OMS	Organização Mundial da Saúde
UFMS	Universidade Federal de Santa Maria

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
	1.1 Glândula mamária.....	11
	1.2 Neoplasia mamária canina.....	12
	1.3 Índice proliferativo pela técnica de evidenciação da região organizadora nucleolar argirofílica (AgNOR).....	18
<b>2</b>	<b>MANUSCRITO.....</b>	<b>21</b>
	2.1 Resumo.....	22
	2.2 Abstract.....	23
	2.3 Introdução.....	24
	2.4 Materiais e métodos.....	25
	2.4.1 Amostras.....	25
	2.4.2 Ensaio laboratoriais.....	26
	2.4.3 Análise estatística.....	27
	2.5 Resultados e discussão.....	27
	2.6 Conclusão.....	30
	2.7 Referências.....	31
<b>3</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>4</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>40</b>

# 1 INTRODUÇÃO

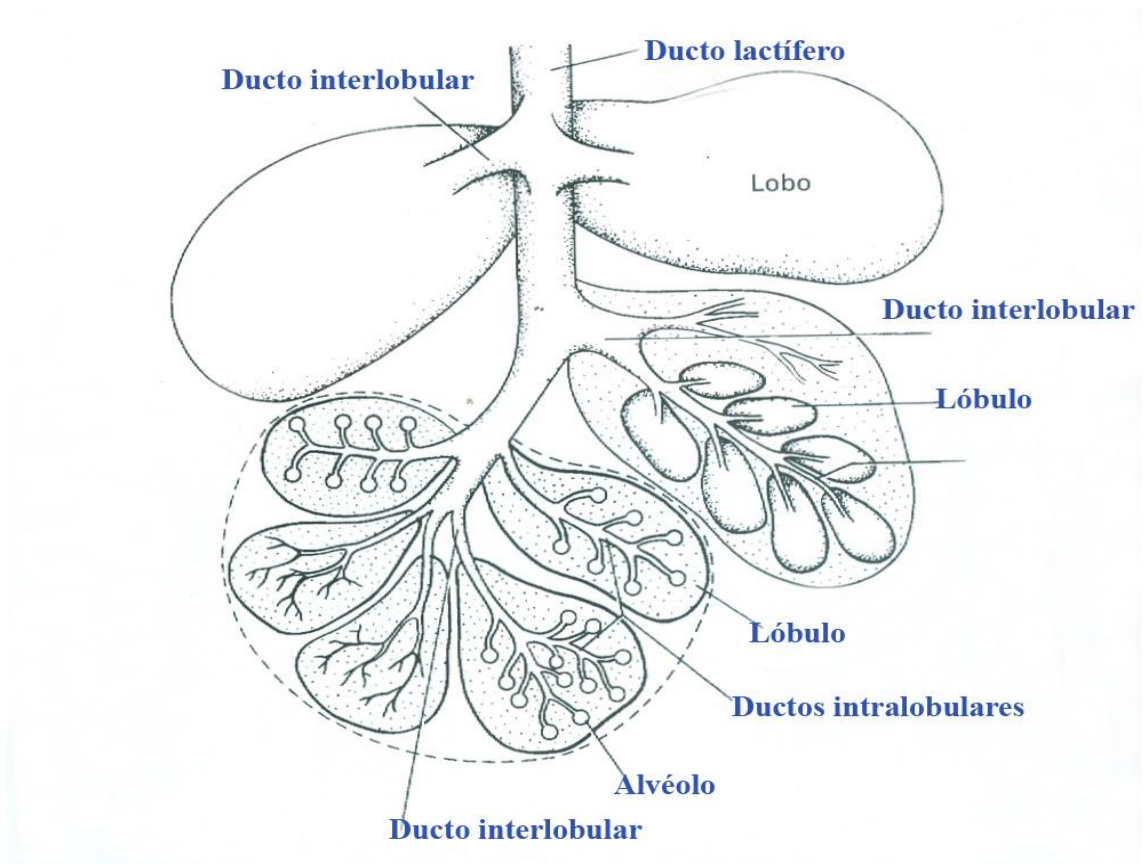
## 1.1 GLÂNDULA MAMÁRIA

A glândula mamária é considerada uma glândula sudorípara apócrina modificada que está presente há milhões de anos nos mamíferos. Compreende uma rede de ductos cercados por um estroma fibrovascular e rico em adipócitos (SORENMO et al., 2011; HECTOR; LINDSAY, 2012). É uma das principais características dos mamíferos, estando presente em ambos os sexos, mas seu desenvolvimento só ocorre na fêmea adulta, principalmente no período gestacional (ELLENPORT, 2008; SORENMO et al., 2011; MACIAS; HINCK, 2012; DAVIDSON; STABENFELDT, 2014).

A glândula mamária possui origem no ectoderma embrionário (DAVIDSON; STABENFELDT, 2014) e surge, embriologicamente da crista mamária que é oriunda do ectoderma ventro-lateral (FOSTER, 2009). A localização dessa crista varia entre as espécies, estendendo-se da região torácica à inguinal em carnívoros e suínos, ou sendo restrita a uma determinada região, como ocorre em elefantes, humanos, ruminantes e equinos, delimitando-se à região axilar, torácica e inguinal, respectivamente (DYCE; SACK; WENSING, 2010).

Estas glândulas são constituídas em suas extremidades por alvéolos, que são as unidades funcionais e, juntamente com seus respectivos ductos alveolares, se juntam para formar os lóbulos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Estes lóbulos contêm ramificações que terminam em pequenos ácinos (COTRAN et al., 1996) e se separam entre si por septos de tecido conjuntivo denso e por tecido adiposo, que drenam a secreção láctea para um ducto excretor chamado de ducto interlobular. Estes ductos, por sua vez, se unem para formar o ducto lactífero, cuja função é coletar a secreção do lobo correspondente, levando-a em direção aos mamilos (PELETEIRO, 1994; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004) (Figura 1).

**Figura 1** – Aspectos histológicos da glândula mamária.



Fonte: Adaptado de Banks, 1993.

Grande parte dos cães desenvolvem 5 pares, apesar de que 4 ou 6 pares já tenham sido identificados em alguns animais. São dois na região torácica (M1 e M2), dois abdominais (M3 e M4) e um par de glândulas mamárias na região inguinal (M5) (SILVER, 1966; GETTY, 2015). Estas glândulas estão organizadas em duas fileiras bilaterais simétricas e paralelas, separadas por um sulco intermamário e localizadas na região ventral do tórax até a região inguinal, em cada lado da linha mediana (PATSIKAS et al., 2006; REESE et al., 2011; NOGUEIRA; CASTRO, 2017).

## 1.2 NEOPLASIA MAMÁRIA CANINA

A glândula mamária está susceptível ao desenvolvimento de tumores e, embora a etiologia não seja muito clara, diversos fatores estão associados ao seu desenvolvimento como hormônios, nutrição, idade e raça (MISDORP et al., 2002; DE NARDI; FERREIRA; ASSUNÇÃO, 2016). Há ainda relatos sobre a influência de fatores genéticos (SORENMO, 2003; BEAUVAIS; CARDWELL; BRODBELT, 2012). Dentre os animais de estimação, a

espécie canina está mais propensa ao câncer, levando, muitas vezes, à elevada mortalidade e prognóstico desfavorável, além de que esses tumores mamários possuem maior incidência em fêmeas (FEITOSA, 2008; SALAS et al., 2015).

Devido à dificuldade de detectar um câncer no estágio inicial em animais de estimação, o diagnóstico geralmente é feito somente quando o tumor se torna visível para o tutor do animal (KUMAR et al., 2020). Nesse contexto, a citologia pode ser um exame de triagem útil para descartar possíveis diagnósticos diferenciais, tais como mastites, lipomas e mastocitomas, além também de identificar metástases ganglionares (QUEIROGA; LOPES, 2002). A confirmação e classificação depende do exame histopatológico (técnica padrão ouro) que permite avaliar outros critérios como, o padrão de crescimento tumoral, características infiltrativas, entre outros (WERNER; WERNER, 2009). Assim, o diagnóstico preciso, bem como a diferenciação entre neoplasias benignas e malignas, é importante para o sucesso dos protocolos de tratamento, especialmente nessa espécie (KUMAR et al., 2020).

Os dois pares caudais (M4 e M5) são os mais predispostos ao desenvolvimento de neoplasias (CAVALCANTI; CASSALI, 2006; MORRIS; DOBSON, 2007; LANA et al., 2007; SORENMO et al., 2009). De acordo com Robbins (2007) e Lana et al. (2007), isso se deve a maior concentração de tecido mamário nessas regiões, e conforme descrito por De Nardi et al. (2008), a maior quantidade de tecido mamário promove maior alteração proliferativa em resposta aos hormônios ovarianos.

Há um grande interesse nas neoplasias mamárias de cães, tanto do ponto de vista prognóstico e terapêutico, quanto do ponto de vista patogênico, além de constituir-se em uma ferramenta para oncologia comparada (FOSTER, 2009). No estudo de Trapp et al. (2010), a neoplasia foi a terceira causa mais comum de morte em cães e o tumor de mama foi a principal patologia que ocasionou a morte de quase metade desses animais.

Davidson e Stabenfeldt (2014) relataram que a exposição da glândula mamária aos hormônios esteroides ovarianos (estrógeno e progesterona) contribui para o aumento das chances de desenvolver um neoplasma. Há também estudos que mostraram a influência da prolactina (PRL), hormônio do crescimento (GH), fatores de crescimento (fator de crescimento tumoral – TGF e fator de crescimento epidermal - EGF) e dos hormônios tireoidianos no processo oncogênico (SILVA; SERAKIDES; CASSALI, 2004; VERSTEGEN; ONCLIN, 2006; DE NARDI et al. 2008). A presença de receptores hormonais no tecido mamário é um sinal importante da dependência desses hormônios (RAMOS et al., 2012).

Como os esteroides ovarianos desempenham um papel importante na etiologia dos tumores mamários caninos, a prevenção mais eficaz é a ovariectomia eletiva do animal em uma

idade precoce (SLEECKX et al., 2011). Existem diferenças significativas quanto ao índice de risco em cadelas castradas e não castradas, dependendo ainda da fase em que a intervenção cirúrgica é efetuada (DE NARDI et al., 2008). A castração de cadelas com até 2,5 anos demonstrou efeito protetor contra o desenvolvimento de neoplasias mamárias e, após esse período, o procedimento eletivo já não tinha nenhum efeito (SCHNEIDER; DORN; TAYLOR, 1969; BEAUVAIS; CARDWELL; BRODBELT, 2012). A incidência de tumores mamários caninos está reduzindo em certas regiões, como nos Estados Unidos e em alguns países da Europa Ocidental, devido ao maior índice de castração nos animais destes países (8 semanas a 7 – 12 meses de idade) (MOE, 2001; EGENVALL et al., 2005). Em contraste, em alguns países europeus como a região da Península Escandinava e a Espanha, a incidência desses tumores é muito alta, pois a castração preventiva não é realizada com frequência (MOE, 2001; PEREZ-ALENZA; TABANERA; PENA, 2001; EGENVALL et al., 2005). De forma geral, estudos avaliando as vantagens e desvantagens da castração mostraram que esse procedimento é benéfico para prevenção de neoplasias mamárias em cadelas, quando realizada antes do primeiro cio ou após os primeiros ciclos, além de ser importante para prevenir o desenvolvimento de tumores ovarianos, uterinos e testiculares, no caso dos machos (ALVES; HEBLING, 2020)

Para a classificação da neoplasia, deve-se, primeiramente, realizar o reconhecimento da origem embriológica das células neoplásicas com base em suas características morfológicas; seguido da identificação do tecido de origem e suas características histológicas ou citológicas, que permitem definir o comportamento do neoplasma como maligno ou benigno. Por fim, a partir disso, designar um nome à neoplasia (WERNER, 2010).

Os tumores benignos normalmente apresentam-se circunscritos, não aderidos aos tecidos adjacentes e são de evolução lenta (DE NARDI et al., 2008), geralmente curáveis e raramente responsáveis pela morte do hospedeiro (KUSEWITT; RUSH, 2009). Em contraste, as neoplasias malignas exibem caráter invasivo e ainda sofrem metástases a novas regiões do corpo (CHEVILLE, 2009), de evolução rápida, associado a um rápido envolvimento dos linfonodos regionais e pulmões (DE NARDI et al., 2008), podendo causar a morte do hospedeiro (KUSEWITT; RUSH, 2009). Características clínicas como fixação na pele e tecidos circundantes, temperatura local, edema, inflamação e ulceração são sinais importantes relacionados ao crescimento maligno (FOWLER, 1974; BENJAMIN, 1999), porém, a ausência de um desses sinais não exclui o comportamento agressivo (CAVALCANTI; CASSALI, 2006). As características malignas são feitas por meio da avaliação do grau de diferenciação, se há presença de anaplasia, invasão de tecidos adjacentes e, principalmente, a invasão de vasos



sanguíneos e linfáticos. Esta última é um sinal seguro de sua capacidade de produzir metástases (WERNER, 2010).

Há diversos métodos de classificação desses tumores abordados na literatura, sendo alguns adaptados de sistemas de classificação em humanos (MISDORP et al. 1972, 1999; HAMPE; MISDORP, 1974). A frequência de tumores mamários varia conforme a existência de diferentes formas de classificação e a ausência de critérios uniformes para diferenciar os tipos. Embora exista uma boa concordância na inclusão de categorias como adenoma, carcinomas invasivos, tumores mistos benignos e carcinomas em tumores mistos, a variação é considerável em outras categorias e várias outras classificações foram relatadas, sendo a mais conhecida a de Misdorp e colaboradores publicada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1999 e a de Goldschmidt et al., (2011). No Brasil, a mais recente foi atualizada por Cassali et al. (2020) com o consenso para diagnóstico, prognóstico e tratamento de tumores mamários caninos (tabela 1) e felinos (não mostrados aqui).

**Tabela 1** – Classificação histológica dos tumores mamários caninos.

(continua)

<b>CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA DOS TUMORES MAMÁRIOS CANINOS</b>	
<b>1. Lesão epitelial não neoplásica</b>	<b>não</b>
	1.1 Hiperplasia ductal
	1.2 Hiperplasia lobular
	1.3 Adenoses
	1.4 Ectasia ductal
	1.5 Lesões de células colunares
	1.6 Alterações de células colunares
	1.7 Hiperplasia de células colunares
<b>2. Tumores benignos</b>	2.1 Adenoma
	2.2 Adenomioepitelioma
	2.3 Mioepitelioma
	2.4 Adenoma basaloide
	2.5 Fibroadenoma
	2.6 Tumor benigno misto
	2.7 Papiloma ductal
	2.8 Tumor filoides
<b>3. Tumores malignos</b>	3.1 Carcinomas
	3.1.1 Carcinoma <i>In Situ</i>
	3.1.1.1 Carcinoma in situ ductal
	3.1.1.2 Carcinoma in situ lobular
	3.1.2 Carcinoma em tumor misto
	3.1.3 Carcinoma papilar (invasivo e não invasivo)
	3.1.4 Carcinoma tubular

**Tabela 1** – Classificação histológica dos tumores mamários caninos.

(conclusão)

---

3.1.5	Carcinoma sólido
3.1.6	Carcinoma basaloide
3.1.7	Carcinoma cribriforme
<b>3.1.8</b>	<b>Tipo especial de carcinomas</b>
3.1.8.1	Carcinoma micropapilar
3.1.8.2	Carcinoma lobular pleomórfico
3.1.8.3	Carcinoma secretório
3.1.8.4	Carcinoma mucinoso
3.1.8.5	Carcinoma rico em lipídios
3.1.8.6	Carcinoma rico em glicogênio
3.1.8.7	Carcinoma de células escamosas
3.1.8.8	Carcinoma de células fusiformes
3.1.8.9	Carcinoma com diferenciação sebácea
3.2	Neoplasias mioepiteliais
3.2.1	Adenomioepitelioma maligno
3.2.2	Mioepitelioma maligno
<b>3.3</b>	<b>Sarcomas</b>
3.3.1	Fibrossarcoma
3.3.2	Osteossarcoma
3.3.3	Carcinossarcoma
3.3.4	Sarcoma em tumor misto
<b>3.3.5</b>	<b>Outros sarcomas</b>
3.3.5.1	Condrossarcoma
3.3.5.2	Lipossarcoma
3.3.5.3	Hemangiossarcoma
3.3.5.4	Sarcoma filoides

---

Fonte: Cassali et al., 2020.

De acordo com a Cassali et al. (2020), os tumores podem ser classificados em lesões epiteliais não-neoplásicas (hiperplasia ductal, hiperplasia lobular, adenoses, ectasia ductal e lesões de células colunares), neoplasias benignas (adenoma, adenomioepitelioma, mioepitelioma, adenoma basalóide, fibroadenoma, tumor misto benigno, papiloma ductal e tumores filoides) e neoplasmas malignos (carcinomas, neoplasias mioepiteliais e sarcomas) (Tabela 1).

Zuccari, Santana e Rocha (2001) realizaram uma pesquisa onde trinta e cinco cadelas portadoras de tumores mamários foram selecionadas. Elas tiveram seus tumores submetidos à exérese cirúrgica e amostras dos mesmos foram coletadas e encaminhadas a laboratórios de patologia clínica e de histopatologia (fragmento tumoral). O resultado foi que 63% dos tumores estudados apresentaram diagnósticos citopatológicos concordantes com a histopatologia. A

análise estatística demonstrou que a citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) é um procedimento pouco sensível, pois a sensibilidade, para que um teste seja conclusivo, deve ser acima de 90%. Por outro lado, a especificidade obtida foi de 83% e é próxima da considerada adequada. Durante a avaliação clínica, a CAAF pode ser realizada antes da cirurgia para diferenciar outros tipos tumorais, processos inflamatórios e hiperplásicos. Isto revela que a CAAF é considerada como um método preliminar de triagem, de rápida execução e que não deve ser usada isoladamente para um diagnóstico definitivo de neoplasmas mamários (CASSALI, 2007; SIMON, 2009).

Em termos de prognóstico, é importante saber se um tumor é benigno ou maligno. As características celulares de malignidade consideradas no exame histopatológico são semelhantes às utilizadas no exame citológico; contudo, a histopatologia permite a avaliação da arquitetura tecidual e dos padrões de crescimento da neoplasia (invasividade) (HAHN, 2007), sendo o exame recomendado e fundamental para todos os casos. Normalmente a avaliação histopatológica é realizada após o procedimento cirúrgico e não avalia apenas o tumor primário, mas sim todas as glândulas mamárias incluindo os linfonodos regionais (CASSALI, 2020). As células são avaliadas para características de malignidade, incluindo morfologia anormal, evidência de invasão e/ou metástase, alto índice mitótico, presença de mitoses anormais, alta relação núcleo:citoplasma e ausência de encapsulamento, além da avaliação do grau de diferenciação (KUSEWITT; RUSH, 2009). A associação entre dados clínicos e o diagnóstico patológico obtido a partir da biópsia tecidual induz a uma estimativa da probabilidade de recidiva nos locais cirúrgicos e de metástase no linfonodo regional ou em outros órgãos (CHEVILLE, 2009).

Antes de planejar o tratamento é importante fazer o estadiamento clínico, uma vez que a detecção de metástase a distância pode alterar a decisão cirúrgica, por exemplo (CASSALI, 2020). Segundo Kusewitt e Rush (2009), o sistema de estadiamento, denominado TNM (ROBBINS, 2007; ALLEN, 1989) traz informações que ajudam a avaliar o tumor primário quanto ao tamanho (T) (ROBBINS, 2007; ARAÚJO, 2015), envolvimento ou não dos linfonodos regionais (N) (ROBBINS, 2007; BARTELS, 1978) e a identificação de metástases a distância (M). Esse estadiamento é realizado de acordo com o sistema proposto pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1980 para a espécie canina (OWEN, 1980) na tentativa de obter informações a respeito do comportamento biológico da lesão, além do uso de marcadores moleculares que auxiliam no diagnóstico e também nos fatores prognósticos (ZUCCARI et al., 2008).

Os tratamentos de câncer atualmente disponíveis podem ser divididos em diferentes categorias, de acordo com seus objetivos e modos de ação. Frequentemente são utilizados como tratamento único ou combinados dependendo das condições que o tumor se apresenta (tamanho, consistência e localização), além do estado clínico do paciente. As três principais categorias de tratamentos são cirurgia e radioterapia, que são tratamentos localizados, e a quimioterapia, uma modalidade sistêmica (RANGEL, 2008). Entretanto, a cirurgia continua sendo o tratamento padrão-ouro para a maioria dos tumores mamários caninos, exceto para casos de doenças inoperáveis altamente metastáticas e para grande parte dos carcinomas mamários inflamatórios (MACEWEN; WITHROW, 1996; MISDORP, 2002).

A sobrevida pode variar significativamente dependendo do tipo de tumor que o animal apresenta e também de características como idade, tamanho, estágio, tipo histológico, grau, comportamento clínico, envolvimento de linfonodos, expressão de receptores de hormônios (ER e PR), expressão de Cox-2, densidade de microvasos, reações celulares linfoides nos tumores vizinhos, marcadores de proliferação celular e alterações genéticas. É necessário que diferentes parâmetros sejam avaliados para obter o melhor prognóstico possível (SLEECKX, 2011). Nesse sentido, a imuno-histoquímica é uma ferramenta muito utilizada no câncer de mama da mulher, uma vez que permite identificar no tecido a expressão de marcadores moleculares que oferecem dados sobre as características e o comportamento tumoral, contribuindo assim para o diagnóstico e prognóstico da enfermidade (ZUCCARI et al., 2008; HORTA et al., 2012).

### 1.3 ÍNDICE PROLIFERATIVO PELA TÉCNICA DE EVIDENCIAÇÃO DA REGIÃO ORGANIZADORA NUCLEOLAR ARGIROFÍLICA (AgNOR)

Nos últimos anos, a técnica AgNOR tem se tornado um método amplamente utilizado na patologia tumoral, principalmente para avaliar a agressividade de neoplasmas malignos e auxiliar na determinação do prognóstico clínico (MELLO; ALVES, 1999; KORNEYEV et al., 2000). Tal conceito indica que o uso das AgNORs possui um valor adicional, podendo ser associado a outros métodos que avaliam a velocidade de crescimento, para, então, obter uma visão mais fidedigna da atividade proliferativa do tumor (MELLO; ALVES, 1999).

Essa técnica se baseia na ligação da prata coloidal às proteínas ácidas, não-histônicas, associadas as regiões organizadoras nucleolares (NORs) (TATEISHI et al., 1995; RIVERO, AGUIAR, 2002; SFACTERIA et al., 2003), e são observadas como pontos intranucleares,

aglomerados, castanho-escuros, isolados de tamanho grande ou pequeno (CROCKER, 1996; DERENZINI, 2000; TRERÈ, 2000; OSHIMA; FORONES, 2001; SFACTERIA et al., 2003; DZIMIRA, 2005). É útil para marcar o DNA ribossomal e seus níveis de transcrição, permitindo a visualização do nucléolo e análise da variação do seu tamanho pelo número de pontos corados pela prata em tecidos (PLOTON et al., 1986; DIAS, 2007).

Em organismos pluricelulares, a taxa de proliferação celular é monitorada por um sistema muito integrado e complexo que permite a replicação dentro dos limites considerados normais. A proliferação celular é uma atividade importante que permite ao organismo restaurar as células perdidas em decorrência do processo de envelhecimento, no entanto, ela deve ocorrer de forma controlada. Caso tal controle seja perdido, a proliferação ocorre de maneira desordenada. Esse desequilíbrio da proliferação celular é uma das principais características de um processo patológico (BOGLIOLO, 2004).

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

Vários estudos sugerem que a associação da quantidade de AgNORs com o prognóstico do câncer é consequência deste valor representar o tempo da velocidade da proliferação celular (DERENZINI, 2000). Assim, um alto valor de AgNOR caracteriza tumores com elevada atividade metabólica e rápida atividade proliferativa, sendo que uma alta quantidade de AgNOR pode ser considerada como um marcador de fenótipo maligno tumoral com prognóstico desfavorável (PICH; CHIUSA; MARGARIA, 2000). Kumar et al. (2010) avaliaram a significância do índice mitótico e da contagem de AgNOR em cortes histológicos de tumores mamários caninos e observaram que as contagens de AgNOR foram significativamente menores nos tumores mamários benignos (tumor mamário misto benigno, fibroadenoma, papiloma ductal e adenoma simples) do que nos malignos (adenocarcinoma papilar, tumor mamário misto maligno, carcinoma sólido, carcinoma de células escamosas, fibrossarcoma, adenocarcinoma infiltrativo, carcinoma mucinoso, osteocondrossarcoma, mixossarcoma, carcinoma intraductal e carcinoma de células fusiformes/mioepitelioma maligno).

Muitos métodos estão sendo utilizados para avaliação celular na oncologia atual. Dessa forma, vários estudos são publicados relacionando os marcadores de proliferação com antígenos nucleares à AgNORs. Durante estudos em humanos, mostrou-se que a atividade proliferativa em neoplasias mamárias relacionando à contagem de AgNOR é um importante meio de prognóstico, uma vez que correlaciona com o tempo de sobrevida, evidenciado na sua associação aos marcadores de proliferação imuno-histoquímicos como o antígeno nuclear de células em proliferação (PCNA) e o índice de marcação MIB-1 (PICH; MARGARIA; CHIUSA, 1994).

A maioria dos trabalhos publicados até o momento com o uso dessa técnica de AgNOR é mais voltado para a histopatologia, sendo escassa a aplicação desse método como marcador de proliferação celular na citopatologia. Assim, ressalta-se a importância de utilizar esta técnica na citopatologia para investigar a sua contribuição ou não no auxílio prognóstico.

Tendo em vista a problemática do tumor de mama na rotina clínica de pequenos animais do HVU-UFSM e o prognóstico reservado para estas neoplasias, o uso de técnicas adicionais como a avaliação do índice proliferativo do tumor pela AgNOR na citopatologia pode auxiliar rapidamente na conduta terapêutica e prognóstica em relação aos neoplasmas. O objetivo desta pesquisa foi avaliar o índice proliferativo em amostras citopatológicas de tumores mamários caninos correlacionando com a histopatologia.

## **2 MANUSCRITO**

Os resultados desse trabalho encontram-se na forma de manuscrito, o qual será submetido para a revista Ciência Rural. As normas da revista podem ser conferidas no site: <http://coral.ufsm.br/ccrrevista/normas.htm>

1 **Avaliação de índice proliferativo em amostras citopatológicas de tumores mamários**  
2 **caninos: correlação histopatológica**

3 **Evaluation of proliferative index in cytopathological samples of canine breast tumors:**  
4 **histopathological correlation**

5  
6 **Dener Barros Morais<sup>1</sup> Ana Martiele Engelmann<sup>1</sup> Nathália Viana Barbosa<sup>1</sup> Cinthia**  
7 **Melazzo de Andrade<sup>1\*</sup>**

8  
9 **RESUMO**

10 As neoplasias estão entre as principais doenças que acometem diretamente as glândulas  
11 mamárias de cadelas. Por conseguinte, observou-se a necessidade de utilizar marcadores  
12 prognósticos para identificar o índice proliferativo desses tumores, como exemplo as regiões  
13 organizadoras nucleolares argirofílicas (AgNOR), com o propósito de auxiliar na instituição de  
14 um protocolo terapêutico adequado. Este estudo objetivou avaliar o índice proliferativo em  
15 amostras citopatológicas de tumores mamários caninos correlacionando com a histopatologia.  
16 As amostras coletadas pela citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) foram analisadas no  
17 Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias da Universidade Federal de Santa Maria, e o  
18 exame histopatológico foi realizado pelo Laboratório de Patologia Veterinária da mesma  
19 instituição. Os dados foram obtidos a partir da análise utilizando software de computador (IBM  
20 SPSS Statistics 23). Os valores de contagem AgNOR das amostras citológicas foram  
21 correlacionados com os laudos histopatológicos por um teste não paramétrico de Kruskal-  
22 Wallis e foi feito também a comparação entre os índices AgNORs de dois avaliadores por meio  
23 do teste de Wilcoxon para análise dos dados. Portanto, não se pode afirmar que existam

---

<sup>1</sup>Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Clínica de Pequenos Animais, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

\*Autor para correspondência. E-mail: cmelazzoandrade1@gmail.com



1 diferenças nas médias dos índices AgNOR dos diferentes tipos histológicos de tumores  
2 mamários para nenhum dos avaliadores ( $p>0,05$ ). Já a comparação entre a contagem dos dois  
3 avaliadores mostrou diferença significativa ( $p<0,05$ ). É necessário que outros estudos sejam  
4 realizados com outros marcadores prognósticos que validem e complementem a técnica de  
5 AgNOR.

6

7 **Palavras-chave:** canino, tumores, citopatologia, marcadores prognósticos.

8

### 9 **ABSTRACT**

10 Neoplasms are among the main diseases that directly affect the mammary glands of bitches.  
11 Therefore, there was a need to use prognostic markers to identify the proliferative index of these  
12 tumors, such as argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNOR), aiming to establish an  
13 adequate therapeutic protocol. This study aimed to evaluate the proliferative index in  
14 cytopathological samples of canine mammary tumors correlating with histopathology. The  
15 samples collected by fine need aspiration cytology (FNAC) were analyzed at the Laboratory of  
16 Veterinary Clinical Analysis Laboratory of the Federal University of Santa Maria, and the  
17 histopathological examination was performed by the Laboratory Veterinary Pathology  
18 Laboratory within the same institution. Data were obtained from the analysis using computer  
19 software (IBM SPSS Statistics 23). The AgNOR count values of the cytological samples were  
20 correlated with the histopathological reports by a non-parametric Kruskal-Wallis test and the  
21 comparison between the AgNORs indices of two evaluators was also made using the Wilcoxon  
22 test for data analysis. Therefore, we were not able to observe differences in the mean AgNOR  
23 indexes of the different histological types of breast tumors for any of the evaluators ( $p>0.05$ ).  
24 The comparison between the counts of the two evaluators showed a significant difference  
25 ( $p<0.05$ ). We are able to conclude that further studies are needed with a larger number of

1 samples and other prognostic markers that may help us to validate and complement the AgNOR  
2 technique.

3

4 **Key words:** canine, tumors, cytology, prognostic markers.

5

## 6 **INTRODUÇÃO**

7 Os neoplasmas estão entre as principais doenças que acometem diretamente as glândulas  
8 mamárias de cadelas e podem ser compostos por diferentes grupos, desde neoplasias  
9 epiteliais e mioepiteliais até as mesenquimais (DE NARDI et al., 2002; MISDORP, 2002;  
10 DAVIDSON; STABENFELDT, 2014). A prevalência de câncer em cães vem aumentando  
11 consideravelmente e a crescente incidência das neoplasias nessa espécie possui vários fatores, os  
12 quais englobam a maior sobrevida destes animais (DE NARDI et al., 2002). Nos tumores de  
13 mama, além da idade, outros fatores que contribuem para o desenvolvimento dessas neoplasias  
14 são influências hormonais, raça, dieta e obesidade (SORENMO et al., 2013).

15 O diagnóstico é feito por meio da abordagem clínica e do estadiamento, avaliação  
16 histopatológica, gradação histológica e imuno-histoquímica (CASSALI, 2020). O  
17 comportamento biológico pode ser determinado pelo tipo histológico e grau, além da expressão  
18 molecular tumoral que pode ser obtida por imuno-histoquímica, dentre outros (SORENMO et al.  
19 2019). Em adição, a avaliação citológica por meio da citologia aspirativa por agulha fina (CAAF)  
20 pode ser efetuada no período pré-cirúrgico para identificar a presença de tumores com origem no  
21 tecido cutâneo, além de processos inflamatórios e hiperplásicos, entretanto, não deve ser usada  
22 para obtenção de um diagnóstico completo em tumores mamários (CASSALI et al., 2007;  
23 SIMON et al., 2009).

24 Considerando a necessidade de avaliar a agressividade tumoral para determinação do  
25 prognóstico clínico, a técnica de evidenciação da região organizadora nucleolar argirofílica

1 (AgNOR) tem se tornado um método muito utilizado com essa finalidade (MELLO; ALVES,  
2 1999; KORNEYEV et al., 2000; TRERÈ, 2000). Essa técnica se baseia em componentes  
3 nucleolares que contém um conjunto de proteínas argirofílicas impregnadas pela prata (TRERÈ,  
4 2000). Tal método indica que o uso das AgNORs possui um valor adicional, podendo ser  
5 associado a outros métodos que avaliam a velocidade de crescimento, obtendo-se, assim, uma  
6 visão mais fidedigna da atividade proliferativa do tumor (MELLO; ALVES, 1999). Há relatos  
7 que sugerem a associação da quantidade de AgNORs com o prognóstico do câncer, como  
8 consequência deste valor representar o tempo de velocidade da proliferação celular  
9 (DERENZINI, 2000). Tendo-se em vista a casuística dos tumores mamários e estes serem  
10 considerados uma das neoplasias mais comuns na rotina clínica veterinária associada à sua  
11 problemática no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Santa Maria, além do  
12 prognóstico reservado para estes neoplasmas, o uso de técnicas adicionais como a avaliação do  
13 índice proliferativo do tumor pela AgNOR na citopatologia pode auxiliar rapidamente na conduta  
14 terapêutica e prognóstica. Desta forma, este estudo tem como objetivo investigar se há  
15 concordância entre a avaliação citopatológica pelo índice proliferativo tumoral pela técnica de  
16 AgNOR e o exame histopatológico, em cadelas com neoplasias mamárias.

17

## 18 **MATERIAIS E MÉTODOS**

### 19 *Amostras*

20 Para este estudo foram analisadas lâminas de citologia aspirativa por agulha fina (CAAF)  
21 no período de março de 2019 a março de 2020, de cadelas com neoplasias mamárias atendidas  
22 no Hospital Veterinário Universitário da Universidade Federal de Santa Maria (HVU/UFSM),  
23 sem distinção de raça e idade. As amostras foram processadas no Laboratório de Análises Clínicas  
24 Veterinárias (LacVet) e o exame histopatológico foi realizado pelo Laboratório de Patologia  
25 Veterinária (LPV) do HVU/UFSM.

1

2 *Ensaio Laboratoriais*

3           As lâminas de "squash" obtidas por CAAF das neoplasias mamárias foram submetidas  
4 à coloração hematológica convencional (Panóptico Rápido) usada na rotina do LacVet e  
5 submetidas ao método AgNOR para obtenção do índice de proliferação celular. Para a  
6 realização desta técnica, foi preparada uma solução de nitrato de prata em concentração de 50%  
7 e uma solução de gelatina coloidal em concentração de 2% de gelatina P.A. e 1% de ácido  
8 fórmico (KRAVIS et al. 1996). No momento do procedimento de impregnação pela prata, as  
9 lâminas contendo amostras de tumores mamários foram imersas em solução de prata na  
10 proporção de 2 volumes de nitrato de prata para 1 volume de gelatina coloidal, em quantidade  
11 necessária para cobrir o número de lâminas a serem impregnadas, dependendo do tamanho do  
12 recipiente onde as mesmas foram submersas horizontalmente, uma sobre a outra, separadas por  
13 um material nas extremidades que impedia que se tocassem. As lâminas cobertas com os  
14 reagentes foram incubadas em estufa a temperatura de 25° C durante 45 minutos. Após a  
15 incubação, foi realizado o enxágue das lâminas em água destilada durante 2 minutos, secagem  
16 ao ar, montagem com lamínulas através do meio de montagem Entellan® e as lâminas  
17 confeccionadas foram visualizadas ao microscópio óptico. Os pontos enegrecidos em 100  
18 núcleos foram contados conforme metodologia recomendada por Crocker et al. (1989) (Figura  
19 1), por dois patologistas clínicos com diferentes níveis de experiência na área: um especialista  
20 e outro mestre. Ambos desconheciam a contagem um do outro, avaliaram as mesmas lâminas  
21 e não tinham nenhuma informação do diagnóstico histopatológico. Posteriormente foi efetuada  
22 a média de três contagens dos dois avaliadores, para cada amostra analisada. Em seguida, foi  
23 obtido o índice AgNOR/núcleo de cada célula dividindo o número total de AgNOR por 100  
24 (KRAVIS et al., 1996).

1 Os esfregaços citológicos que apresentaram pequeno número de células intactas,  
2 excessiva contaminação sanguínea, elevada quantidade de artefatos ou ausência do laudo  
3 histopatológico foram excluídos da análise citológica e estatística.

#### 4 *Análise Estatística*

6 Os dados obtidos foram analisados utilizando o *software* IBM SPSS Statistics 23. A  
7 normalidade dos dados foi descartada por meio dos testes de Kolmogorov-Smirnov e de  
8 Shapiro-Wilk, sendo os valores da contagem de AgNOR das amostras citológicas comparadas  
9 com os resultados dos laudos histopatológicos (neoplasias mamárias malignas, benignas ou  
10 hiperplasia) por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Foi feita também a  
11 comparação entre os índices AgNORs dos dois avaliadores por meio do teste de Wilcoxon. As  
12 conclusões consideraram o nível de 5% de significância.

## 14 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

15 A frequência AgNOR foi determinada em 31 tumores mamários. Desses tumores  
16 avaliados, de acordo com o exame histopatológico, 26 eram neoplasmas malignos (carcinoma  
17 e mioepitelioma, carcinoma em tumor misto, carcinoma complexo, carcinoma simples túbulo-  
18 papilar, carcinosarcoma e carcinoma simples sólido com invasão dérmica), duas neoplasias  
19 benignas (adenoma complexo) e três foram causados por alterações não neoplásicas  
20 (hiperplasia mamária lobular), conforme demonstrado na Tabela 1.

21 A média e desvio padrão do índice AgNOR dos dois avaliadores nas amostras  
22 citológicas de neoplasias mamárias malignas, benignas e lesões hiperplásicas em cadelas está  
23 demonstrado na Tabela 2. Contudo, como os grupos com apenas um ou dois diagnósticos  
24 (Carcinosarcoma, Carcinoma simples sólido com invasão dérmica e Adenoma complexo)  
25 poderiam distorcer os dados, os mesmos foram excluídos da análise. No entanto, mesmo assim,

1 os resultados indicam que não houve diferença estatística entre os demais tumores analisados e  
2 o índice AgNOR para nenhum dos avaliadores ( $p>0,05$ ), embora a comparação entre os dois  
3 avaliadores mostrou que houve diferença entre ambos, pois  $p<0,05$ .

4 Em geral, tumores benignos não têm crescimento destrutivo ou invasivo e são  
5 frequentemente encapsulados. Já nos tumores malignos, é comum a presença de necrose, perda  
6 de diferenciação, polimorfismo celular e nuclear, alto índice mitótico, alta densidade de  
7 microvasos e membranas basais descontínuas (RESTUCCI et al. 2000; MISDORP, 2002).

8 Os neoplasmas mesenquimais (sarcomas) são menos comuns do que os carcinomas,  
9 compreendendo menos de 5% de todos os tumores mamários nessa espécie e menos de 13% de  
10 todos os tumores mamários malignos (SLEECKX, 2011). Isso corrobora com o nosso estudo,  
11 mesmo com um pequeno número de amostras. O carcinosarcoma, que é um tumor mamário  
12 maligno misto composto em parte por células que se assemelham morfológicamente ao  
13 componente epitelial e, em parte, por células semelhantes ao tecido conjuntivo (MISDORP,  
14 1972; MISDORP, 1973), foi o único tumor diagnosticado dessa classe.

15 No estudo de De Nardi (2015) o carcinoma foi o tipo histológico mais encontrado e,  
16 num estudo retrospectivo feito por Biondi e colaboradores (2014), houve predomínio do  
17 carcinoma tubular, compreendendo 38,2% dos tumores malignos. No presente trabalho também  
18 houve mais diagnósticos de carcinomas, predominando mais casos do carcinoma em associação  
19 ao mioepitelioma, sendo ambos os componentes epitelial e mioepitelial malignos (26,92% dos  
20 tumores nocivos).

21 Já em relação as alterações não neoplásicas, a hiperplasia lobular pode ser encontrada  
22 no tecido mamário adjacente a neoplasias benignas ou malignas (GOLDSCHMIDT, 2011).  
23 Segundo Foster (2013), a hiperplasia lobular pode progredir para displasia e posteriormente  
24 para uma neoplasia e, a partir de um tumor benigno como o adenoma, se transformar em uma  
25 neoplasia maligna como o carcinoma. Já foi relatado em outros estudos que cadelas que

1 apresentam hiperplasia atípica estão mais susceptíveis ao desenvolvimento de neoplasias  
2 mamárias (MOUSER et al., 2010). Entretanto, em estudos na espécie humana, há um maior  
3 potencial de transformação maligna das lesões lobulares atípicas em relação às lesões sem  
4 atipia. Contudo, em cães, essas lesões são raras e tal fato impede uma possível avaliação de seu  
5 potencial de transformação maligna (CASSALI; FERREIRA; DE CAMPOS, 2017). Em nosso  
6 experimento, dos três casos diagnosticados como hiperplasia mamária lobular, não foi  
7 observado nenhum tipo de atipia.

8 Rao et al., (2009), relataram que as hiperplasias nas mamas do referido animal,  
9 promovem alterações de expressão gênica envolvidas na proliferação e adesão celular, que são  
10 processos necessários para a homeostase celular, e quando modificadas tornam-se vulneráveis  
11 ao processo cancerígeno. Alterações no padrão de expressão em fatores de transcrição, nos  
12 genes envolvidos para manter a integridade do DNA e motilidade celular também podem  
13 indicar estágios iniciais de transformação maligna. Neste contexto, alterações não neoplásicas  
14 como as hiperplasias são importantes fatores de risco para o câncer de mama (HARTMANN;  
15 SELLERS; FROST, 2005).

16 Acredita-se, portanto, que não houve diferença significativa entre a contagem do índice  
17 AgNOR de alterações hiperplásicas com os neoplasmas malignos e benignos, em decorrência  
18 dessas lesões já estarem em atividade proliferativa marcando assim, uma elevada quantidade  
19 de pontos enegrecidos de regiões argirofílicas nos núcleos celulares. Além disso, apesar dos  
20 carcinomas e mioepiteliomas malignos apresentarem um ligeiro aumento nos valores de  
21 AgNORs em relação a outras lesões, não houve dados estatísticos significativos que explicaria  
22 essa diferença.

23 Em um estudo realizado por Ansari et al. (2008) notou-se que a morfologia das regiões  
24 nucleolares coradas pela prata era diferente entre as lesões malignas e benignas. Nos tumores  
25 malignos os pontos eram grandes, grossos, muitas vezes profundamente manchado, de tamanho

1 e distribuição variável, além de que, *clusters* eram frequentemente observados. Já os tumores  
2 benignos, estes se mostravam mais finos, redondos e individualmente dispersos no núcleo. No  
3 nosso estudo, não houve diferença entre um e outro baseada nesses critérios.

4 Zapulli et al. (2019) constataram em seus estudos que 40 a 60% das neoplasias mamárias  
5 em cadelas são malignas. Em nosso trabalho, 83,87% desses tumores foram classificados como  
6 malignos, 9,67% como hiperplasia mamária lobular e 6,45% classificados como benignos, o  
7 que se assemelha ao que foi relatado por Toríbio et al. (2012), Montserrat et al. (2016) e Nunes  
8 et al. (2018) que identificaram uma maior prevalência dos tumores malignos.

9 Alguns trabalhos relataram um número elevado de regiões organizadoras nucleolares  
10 argirofílicas em neoplasmas mamários classificados como nocivos quando comparados a  
11 células de tumores não malignos (TRERÈ, 2000; ANSARI et al. 2008; BUNDGAARD-  
12 ANDERSEN et al. 2008; MONTSERRAT et al. 2016). Os dados aqui demonstrados  
13 corroboram com os já relatados, entretanto, como houve apenas dois tumores benignos e três  
14 hiperplasias lobulares encontradas em nosso estudo, isso mostra que o número de amostras  
15 analisadas foi um fator limitante, inviabilizando conclusões estatísticas fidedignas. Além disso,  
16 outro ponto importante que pode ter tido influência nos resultados dos índices AgNORs dos  
17 dois avaliadores foi em relação ao campo/área de contagem que foi analisada tendo impactado  
18 negativamente a concordância entre os patologistas. Acredita-se ainda que os diferentes níveis  
19 de especialização entre os avaliadores, pode ter resultado maior variabilidade na contagem do  
20 presente estudo.

21

## 22 **CONCLUSÃO**

23 Do total de neoplasias que foram avaliadas, os tipos histológicos predominantes foram  
24 carcinoma e mioepitelioma maligno. A análise citopatológica por meio da técnica AgNOR não  
25 demonstrou diferença estatística significativa entre os diferentes tipos histológicos de tumores



1 mamários (neoplasias malignas, benignas e hiperplasia lobular). A principal limitação deste  
2 estudo foi o baixo número de casos incluídos e apesar do “n” ser pequeno, o nosso trabalho  
3 contribuiu para ser o início de estudos posteriores utilizando esse marcador na citopatologia. É  
4 importante ressaltar ainda a necessidade de outros estudos com uma amostragem maior que  
5 englobem diferentes neoplasias benignas, malignas e hiperplasias, uma vez que a presença de  
6 malignidade é muito mais comum que a de neoplasmas benignos em tumores mamários. Em  
7 adição, é importante que sejam realizados outros estudos com outros marcadores prognósticos  
8 que avaliem e complementem a técnica de AgNOR como o Ki-67 e c-kit e ainda mais pesquisas  
9 que avaliem a variação nos pontos enegrecidos de AgNOR nos diferentes tipos histológicos  
10 após tratamento.

11

12 **Financiamento:** Parte deste estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de  
13 Pessoal de Nível Superior (CAPES).

14

## 15 **REFERÊNCIAS**

16

17 ANSARI, H. A. et al. AgNORs in breast tumor cytology smears. **Journal of cytology**. v. 28, n.  
18 3, 2008.

19

20 BIONDI, L. R. et al. Neoplasias Mamárias Caninas em Santos, Brasil: Perfil Clinicopatológico  
21 e de Sobrevida. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 51, n. 3,  
22 2014.

23

24 BOSTOCK, D. E.; MORIARTY, J.; CROCKER, J. Correlation between histologic diagnosis  
25 mean nucleolar organizer region count and prognosis in canine mammary tumors. **Veterinary**  
26 **Pathology**, v. 29, p. 381 - 385, 1992. Disponível em:  
27 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1413404/>. Acesso em: 11 mai. 2021. DOI:  
28 10.1177/030098589202900502.

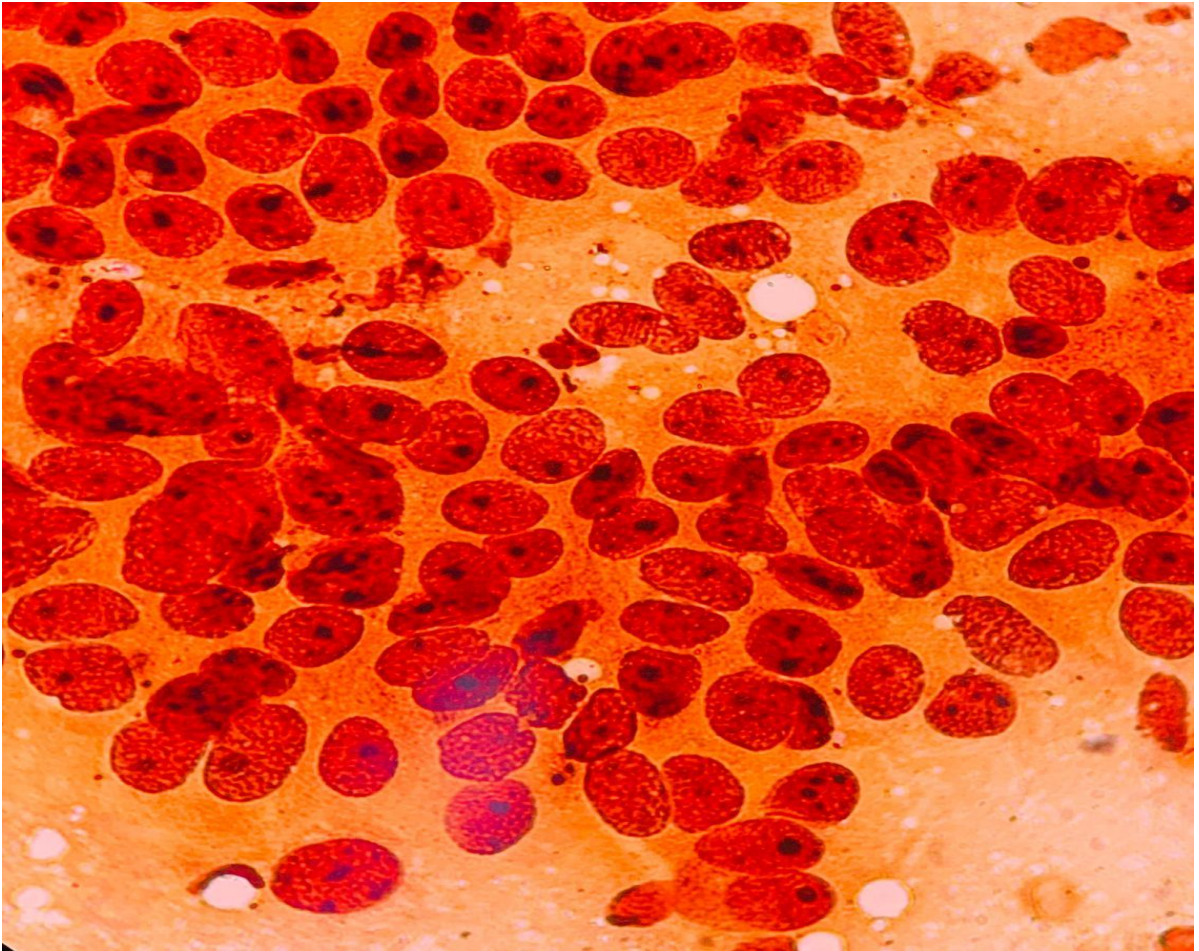
29

- 1 BUNDGAARD-ANDERSEN, K. et al. Correlation between the Histopathological Diagnosis  
2 by AgNOR Count and AgNOR Area in Canine Mammary Tumours. **Journal of Veterinary**  
3 **Internal Medicine**, v. 22, n. 5, p. 1174 - 1180, 2008. Disponível em:  
4 <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1939-1676.2008.0144.x>. Acesso em: 19 jan.  
5 2021. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2008.0144.x  
6
- 7 CASSALI, G. D. et al. Evaluation of accuracy of fine needle aspiration cytology for diagnosis  
8 of canine mammary tumors: comparative features with human tumors. **Cytopathology**, v. 18,  
9 n. 3, p. 191 - 196, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17573766/>. Acesso  
10 em: 09 mar. 2021. DOI: 10.1111/j.1365-2303.2007.00412.x  
11
- 12 CASSALI, G. D.; FERREIRA, E.; DE CAMPOS, C. B. Lesões Benignas Não Neoplásicas. In:  
13 **Patologia mamária canina: do diagnóstico ao tratamento**. São Paulo: MedVet, 2017.  
14
- 15 CASSALI, et al. Consensus Regarding the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine and  
16 Feline Mammary Tumors – 2019. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 13, n. 3, p.  
17 555 - 574, 2020. Disponível em: <https://bjvp.org.br/banner/2020/11/v-13-n-3-1/>. Acesso em:  
18 09 dez. 2020. DOI: 10.24070/bjvp.1983-0246.v13i3p555-574.  
19
- 20 CROCKER J. et al. How should we count AgNORS? Proposals for a standardized approach. **J**  
21 **Pathol.** v. 158, n. 3, p. 185 - 188, 1989.  
22
- 23 DAVIDSON, A. P.; STABENFELDT, G. H. A Glândula Mamária. In: KLEIN, B.G. **Tratado**  
24 **de Fisiologia Veterinária/CUNNINGHAM**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 439 – 448,  
25 2014.
- 26 DE NARDI, A. B. et al. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães,  
27 atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal do Paraná. **Archives of Veterinary**  
28 **Science**, v. 7, p. 15 - 26, 2002.  
29
- 30 DE NARDI, A. B. Oncologia. In: CRIVELLENTI, L. Z.; BORIN-CRIVELLENTI, S. In: **Casos**  
31 **de Rotina em Medicina Veterinária de Pequenos Animais**. 2 ed. São Paulo: MedVet, 2015.  
32 p. 730-757.

- 1  
2 DERENZINI, M. The AgNORs. **Micron**, v. 31, n. 2, p. 117 - 120, 2000. DOI: 10.1016/s0968-  
3 4328(99)00067-0  
4  
5 FOSTER, R. A. Sistema Reprodutor da Fêmea e Glândula Mamária. In: **Bases da Patologia**  
6 **em Veterinária**. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 1088 - 1129, 2013.  
7  
8 GOLDSCHMIDT, M. et al. Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary**  
9 **Pathology**, v. 48, n. 1, 117 - 131, 2011. Disponível em:  
10 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21266722/>. Acesso em: 07 mai. 2021. DOI:  
11 10.1177/0300985810393258.  
12  
13 HARTMANN, L. C. et al. Benign breast disease and the risk of breast cancer. **The New**  
14 **England Journal of Medicine**. v. 353, n. 3, p. 229 - 237, 2005. Disponível em:  
15 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16034008/>. Acesso em: 20 fev. 2021. DOI:  
16 10.1056/NEJMoa044383.  
17  
18 KORNEYEV, I. A. et al. Interphase argyrophilic nucleolar regions and nucleolar counts in  
19 transitional cell bladder tumours. **Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology**, v. 53,  
20 n. 3, p. 129 - 132, 2000. Disponível em:  
21 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1186918/>. Acesso em: 30 jan. 2021. DOI:  
22 10.1136/mp.53.3.129.  
23  
24 KRAVIS, L. D. et al. Frequency of argyrophilic nucleolar organizer regions in fine-needle  
25 aspirates and biopsy specimens from mast cell tumors in dogs. **Journal American Veterinary**  
26 **Medical Association**. v. 209, p. 1418 - 1420, 1996.  
27  
28 MELLO, E. S.; ALVES, V. A. F. Marcadores de Proliferação Celular In: ALVES, V. A. F.;  
29 BACCHI, C. E.; VASSALO, J. **Manual de Imuno-histoquímica**. Editora Sociedade Brasileira  
30 de Patologia. São Paulo, p. 182 - 194, 1999.  
31  
32 MISDORP, W. et al. Tumores mamários malignos caninos: II. Adenocarcinomas, carcinomas  
33 sólidos e carcinomas de células fusiformes. **Veterinary Pathology**. v. 9, p. 447 - 470, 1972.

- 1  
2 MISDORP, W. et al. Tumores mamários malignos caninos: III. Tipos especiais de carcinomas,  
3 tumores mistos malignos. **Veterinary Pathology**, v. 10, p. 241 - 256, 1973.  
4  
5 MISDORP, W. Tumors of the Mammary Gland. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in Domestic**  
6 **Animals**. Iowa: Editora Iowa State Press, 4 ed. p. 575 - 606, 2002.  
7  
8 MONTSERRAT et. al. Zona organizadora de nucléolo e sua relação com a epidemiologia de  
9 cadelas com neoplasia mamária. **Archives of Veterinary Science**. v.21, n.1, p.82-90, 2016.  
10  
11 MOUSER, P. et al. Prevalence and classification of spontaneous mammary intraepithelial  
12 lesions in dogs without clinical mammary disease. **Veterinary Pathology**, v. 47, n. 2, p. 275–  
13 284, mar. 2010. <https://doi.org/10.1177/0300985809358603>  
14  
15 NUNES, F. C. et al. Epidemiological, clinical and pathological evaluation of overall survival  
16 in canines with mammary neoplasms. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 70, n. 6, p. 1714 -  
17 1722, 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-10217>  
18  
19 RAO, N. A. S. et al. Gene expression profiles of progestin-induced canine mammary  
20 hyperplasia and spontaneous mammary tumors. **Journal of Physiology and Pharmacology:**  
21 **An Official Journal of the Polish Physiological Society**, v. 60 Suppl 1, p.73–84, 2009.  
22  
23 RESTUCCI, B.; DE VICO, G.; MAIOLINO, P. Evaluation of angiogenesis in canine  
24 mammary tumors by quantitative platelet endothelial cell adhesion molecule  
25 immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**, v. 37, n. 4, p. 297 - 301, 2000. Disponível em:  
26 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10896390/>. Acesso em: 11 jun. 2021. DOI: 10.1354/vp.37-4-  
27 297.  
28  
29 SIMON, D. et al. Cytologic examination of fine-needle aspirates from mammary gland tumors  
30 in the dog: diagnostic accuracy with comparison to histopathology and association with  
31 postoperative outcome. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 38, n. 4, p. 521 - 528, 2009.  
32  
33 SLEECKX, N. et al. Canine mammary tumours, an overview. **Reproduction in Domestic**  
34 **Animals**. v. 46, n. 6, p. 1112 – 1131, 2011. Disponível em:

- 1 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21645126/>. Acesso em: 09 jun. 2021. DOI: 10.1111/j.1439-  
2 0531.2011.01816.x  
3
- 4 SORENMO, K. U. et al. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M.  
5 **Withrow & MacEwen`s small animal clinical oncology**. 5. ed. Philadelphia: Saunders  
6 Company, p.553-571, 2013.  
7
- 8 SORENMO, K. U. et al. Developing and testing prognostic bio-scoring systems for canine  
9 mammary gland carcinomas. **Vet Comp Oncol**. v. 17, n. 4, p. 479 - 488, 2019.  
10
- 11 TRERÈ, D. AgNOR Staining and quantification. **Micron**. v. 31, n. 2, p. 127 - 131, 2000.  
12 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10588058/>. Acesso em: 07 jan. 2021. DOI:  
13 10.1016/s0968-4328(99)00069-4.  
14
- 15 TORÍBIO, J. M. et al. Caracterização clínica, diagnóstico histopatológico e distribuição  
16 geográfica das neoplasias mamárias em cadelas de Salvador, Bahia. **Revista Ceres**, v. 59, n. 4,  
17 p. 427 - 433, 2012. Disponível em:  
18 <https://www.scielo.br/j/rceres/a/xvzjSWwDJmrj9DHSgKpFjyJ/abstract/?lang=pt>. Acesso em:  
19 01 mai. 2021. DOI: 10.1590/S0034-737X2012000400001.  
20
- 21 ZAPPULLI, V. et al. Mammary tumors. In: **Surgical Pathology of Tumors of Domestic**  
22 **Animals**, 4 ed. v. 2, 2019.



1

2 Figura 1 – Aspecto microscópico das AgNORs em amostra citológica de um tumor mamário  
3 canino (1000x).

1 Tabela 1 – Diagnóstico histopatológico de 31 tumores mamários caninos.

<b>DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO</b>	<b>Quantidade por tumor</b>
Carcinoma e mioepitelioma maligno	7
Carcinoma em tumor misto	6
Carcinoma simples túbulo-papilar	5
Carcinoma complexo	5
Hiperplasia mamária lobular	3
Carcinossarcoma	2
Adenoma complexo	2
Carcinoma simples sólido com invasão dérmica	1
<b>TOTAL</b>	<b>31</b>

2

- 1 Tabela 2 – Índices AgNOR em amostras citopatológicas de neoplasias malignas, benignas e  
 2 lesões hiperplásicas de 31 tumores mamários caninos.

<b>Comparações AgNOR's</b>				
<b>Diagnóstico histopatológico</b>	<b>M (1)</b>	<b>DP (1)</b>	<b>M (2)</b>	<b>DP (2)</b>
Carcinoma simples túbulo-papilar	1,58864	0,1966509	1,44732	0,1195237
Carcinoma em tumor misto	1,84275	0,2179325	1,4633	0,1579923
Carcinoma e mioepitelioma maligno	2,4533	0,8755133	1,986143	0,4166845
Carcinoma complexo	2,10864	0,6216213	1,6733	0,5610249
Carcinossarcoma	1,9383	0,6905605	1,93165	0,15323
Adenoma complexo	1,84995	0,0376888	1,70665	0,0094045
Hiperplasia mamária lobular	1,8633	0,2192804	1,587733	0,0955921

- 3 M (1): média do avaliador 1; DP (1): desvio padrão do índice AgNOR para cada tipo histológico  
 4 calculado pelo avaliador 1; M (2): média do avaliador 2; DP (2): desvio padrão do índice  
 5 AgNOR para cada tipo histológico calculado pelo avaliador 2.



### **3 CONCLUSÃO**

Por meio deste estudo, não foi possível concluir que a técnica de AgNOR em amostras citológicas de cadelas com neoplasias mamárias atendidas no LacVet/HVU/UFSM seja um bom marcador de proliferação celular, já que o número de amostras analisadas até o momento não foi suficiente para obter dados estatísticos significativos.

O nosso trabalho contribuiu para o início de estudos utilizando a técnica de AgNOR na citopatologia. É importante ressaltar ainda, a necessidade de outros estudos com uma amostragem maior que englobe diferentes neoplasias benignas, malignas e lesões não neoplásicas como as hiperplasias e com isso validar esta técnica para poder utilizá-la como auxílio no estadiamento tumoral.

## REFERÊNCIAS

ALLEN, S. W.; MAHAFFEY, E. A. Canine mammary neoplasia: prognostic indicators and response to surgical therapy. **Journal of the American Animal Hospital Association**. v. 25, p. 540 - 546, 1989.

ALVES, B. F. A.; HEBLING, L. M. G. F. Vantagens e desvantagens da castração cirúrgica de cães domésticos. Uma revisão integrativa de literatura. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 9, p.73157-73168, sep. 2020. DOI:10.34117/bjdv6n9-683. Disponível em: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/17458/14170>. Acesso em: 20 abr. 2021

ARAÚJO, M. R. et al. Quantitation of the Regional Lymph Node Metastatic Burden and Prognosis in Malignant Mammary Tumors of Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n.5, p.1360-1367, 2015. DOI: 10.1111/jvim.13576. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jvim.13576>. Acesso em: 23 mar. 2021

BARTELS, K. E. et al. Simultaneous bilateral mastectomy in the dog. **Veterinary Surgery**. v. 7, n. 4, p. 97-102, 1978. DOI:10.1111/j.1532-950X.1978.tb00591.x.

BEAUVAIS, W.; CARDWELL, J.; BRODBELT, D. The effect of neutering on the risk of mammary tumours in dogs – a systematic review. **Journal of Small Animal Practice**. v. 53, n. 6, p. 314-322, 2012. DOI: 10.1111/j.1748 5827.2012.01220.x

BENJAMIN, S. A.; LEE, A. C, SAUNDERS, W. J. Classification and Behavior of Canine Epithelial Neoplasms Based on Life-Span Observations in Beagles. **Veterinary Pathology**. v. 36, n. 5, p. 423 - 436, 1999. DOI: 10.1354/vp.36-5-423. Disponível em: [https://journals.sagepub.com/doi/10.1354/vp.36-5-423?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%20%20pubmed](https://journals.sagepub.com/doi/10.1354/vp.36-5-423?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed)

BOGLIOLO, L. **Patologia Geral**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

CASSALI, G. D. et al. Evaluation of accuracy of fine needle aspiration cytology for diagnosis of canine mammary tumors: comparative features with human tumors. **Cytopathology**. v. 18, p. 191 - 196, 2007. DOI: 10.1111/j.1365-2303.2007.00412.x

CASSALI, G. D. et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors - 2013. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**. v. 7, n. 2, p. 38 - 69, 2014.

CASSALI, G. D. et al. Consensus Regarding the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine and Feline Mammary Tumors – 2019. **Brazilian Journal Veterinary Pathology**, v. 13, n. 3, p. 555 - 574, 2020. DOI: 10.24070/bjvp.1983-0246.v13i3p555-574.

CAVALCANTI, M. F.; CASSALI, G. D. Prognostic factors in the clinical and histopathological diagnosis of breast tumors in bitches - review. **Clínica Veterinária**. v. 11, n. 61, p. 56 - 64, 2006.

CHEVILLE, N. F. **Introdução à Patologia Veterinária**. 3. ed. Barueri: Manole, p. 210 – 283, 2009.

COTRAN, R.S. et al. Neoplasias. In: ROBBINS, S. L. **Patologia estrutural e funcional**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 213-268, 1996.

CROCKER, J. Lymphoid aggregates in bone marrow trephine: new approach to a continuing problem. **Journal Pathology**. v. 178, p. 367 - 368, 1996.

DAVIDSON, A. P.; STABENFELDT, G. H. A Glândula Mamária. In: KLEIN, B.G. **Tratado de Fisiologia Veterinária/CUNNINGHAM**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 439-448, 2014.

DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; ROCHA, N. S.; FERNANDES, S. C. Neoplasias Mamárias. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em Cães e Gatos**. São Paulo: Roca, p. 371-384, 2008.

DE NARDI, A. B. et al. Neoplasias Mamárias. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B. **Oncologia em cães e gatos**. 2. ed. Rio de Janeiro - RJ: Roca, cap. 40. p. 726 – 756, 2016.

DERENZINI, M. The AgNORs. **Micron**, v. 31, p.117 - 120, 2000.

DIAS, M. F. **Estudo da aplicabilidade de critérios morfológicos e morfométricos para a graduação de mastocitomas cutâneos em caninos**. 61 f. Mestrado - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2007.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. O Tegumento Comum. In \_\_\_\_\_. **Tratado de Anatomia Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 355-373, 2010.

DZIMIRA, S.; MADEJ, J. A.; NOWAK, M. Studies on nucleolar organiser regions (AgNORs) in selected spontaneous and transplantable animal tumors. **Polish Journal of Veterinary Sciences**. v. 8, n. 2, p.127 - 135, 2005.

EGENVALL, A. et al. Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 69, p. 109 - 127, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.01.014>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167587705000383?via%3Dihub>

ELLENPORT, C. R. Aparelho Urogenital. In: SISSON, S. & GROSSMAN, J. D. **Anatomia dos Animais Domésticos/GETTY**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1v. p. 136-139, 2008.

FEITOSA, F. L. F. Semiologia da Glândula Mamária de Éguas, Cadelas e Gatas. In \_\_\_\_\_. **Semiologia Veterinária: A Arte do Diagnóstico**. 2. ed. São Paulo: Roca, p. 349 - 352, 2008.

FOSTER, R. A. Sistema Reprodutivo da Fêmea. In: McGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Bases da Patologia em Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p. 1263-1316.

FOWLER, E. H.; WILSON, G. P.; KOESTNER, A. Biologic Behavior of Canine Mammary Neoplasms Based on a Histogenic Classification. **Veterinary Pathology**. v. 11, p. 212 - 229, 1974. DOI: 10.1177/030098587401100303

GETTY, R. **Sisson & Grossman: Anatomia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. p. 1493.

GOLDSCHMIDT, M. et al. Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**. v. 48, n. 1 p. 117 - 131, 2011.

HAHN, K. A. Diagnóstico de Neoplasia. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2007. 2v. p. 2313-2323.

HAMPE, J. F.; MISDORP, W. Tumours and dysplasias of the mammary gland. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 50, n. 1-2, p. 111 – 133, 1974.

HORTA, R. S. et al. Fatores prognósticos e preditivos dos tumores caninos definidos com auxílio da imuno-histoquímica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 6, p. 1033 - 1039, 2012.

Disponível em:  
<https://www.scielo.br/j/cr/a/GLJjtQYgYTWZmJVzzvfYZt/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 10 jun. 2021.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Aparelho reprodutor feminino. In L.C. JUNQUEIRA, J. CARNEIRO. **Histologia Básica**. 10<sup>th</sup>. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 449 - 452.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Aparelho reprodutor feminino. In: \_\_\_\_ **Histologia Básica**. 11<sup>th</sup>. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. cap. 22, p. 431-451.

KORNEYEV, I. A. et al. Interphase argyrophilic nucleolar organizer regions and nucleolar counts in transitional cell bladder tumours. **Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology**. v. 53, p. 129 - 132, 2000. Disponível em:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1186918/>. Acesso em: 08 mai. 2021. DOI: 10.1136/mp.53.3.129

KUMAR, P. et al; Diagnostic significance of mitotic index and AgNOR count in canine mammary tumours. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**. v. 3, n. 1, p. 41 - 45, 2010.

KUMAR, A. et al. Deep feature learning for histopathological image classification of canine mammary tumors and human breast cancer. **Information Sciences**, v. 508, p. 405 - 421, 2020.

Disponível em:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0020025519308229?via%3Dihub>. Acesso em: 12 abr. 2021. DOI: 10.1016/j.ins.2019.08.072

KUSEWITT, D. F.; RUSH, L. J. Neoplasia e Biologia Tumoral. In: McGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Bases da Patologia em Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p. 253 - 298.

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

MACIAS, H.; HINCK, L. Mammary gland development. **Wires Developmental Biology**. v. 1, n. 4, p. 553 - 557, 2012. DOI: 10.1002/wdev.35

MACEWEN, E. G.; WITHROW, S. Tumors of the mammary gland. **Small Animal Clinical Oncology**. Saunders Company, Philadelphia, 1996. p. 356 - 372.

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**. Sociedade Brasileira de Patologia. São Paulo, 1999. p. 182 - 194.

MISDORP, W. et al. Canine malignant mammary-tumors. 2. Adenocarcinomas, solid carcinomas and spindle cell carcinomas. **Veterinary Pathology**. v. 9, p. 447 – 470, 1972.

MISDORP, W. et al. Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat, 2nd edn. **Armed Forces Institute of Pathology**, Washington D. C., 1999.

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

MOE, L. Population-based incidence of mammary tumours in some dog breeds. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**. v. 57, p. 439 - 443, 2001.

MORRIS, J.; DOBSON, J. Glândula Mamária. In\_\_\_\_. **Oncologia em Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, 2007. p. 185-192.

MOURAD, W. A. et al. Argyrophilic nucleolar organizer regions in breast carcinoma. Correlation with DNA flow cytometry, histopathology, and lymph node status. **Cancer**. v. 69, n. 7, p. 1739 - 1744, 1992. Disponível em:

[https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1097-](https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1097-0142(19920401)69:7%3C1739::AID-CNCR2820690715%3E3.0.CO%3B2-9)

0142(19920401)69:7%3C1739::AID-CNCR2820690715%3E3.0.CO%3B2-9. Acesso em: 02 jan. 2021. DOI: 10.1002/1097-0142(19920401)69:7<1739::AID-CNCR2820690715>3.0.CO;2-9.

NOGUEIRA, J. C.; CASTRO, A. C. S. Morfologia das glândulas mamárias (Mammae) de Cadelas. In: CASSALI, G. D. et al. **Patologia mamária canina: do diagnóstico ao tratamento**. São Paulo: Medvet, 2017, p. 01 - 13.

OSHIMA, C. T. F.; FORONES, N. M. AgNOR em câncer gástrico. **Arquivos de Gastroenterologia**. v. 38, n. 2, p. 89 - 93, 2001.

OWEN, L. N. TNM Classification of tumors in domestic animals. **World Health Organization**. 1. ed. Geneva, 1980.

PATSIKAS, M. N. et al. The lymph drainage of the neoplastic mammary glands in the bitch: a lymphographic study. **Anatomia, Histologia, Embryologia**. v. 35, n. 4, p. 228 - 234, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16836586/>. Acesso em: 04 abr. 2021. DOI: 10.1111/j.1439-0264.2005.00664.x

PELETEIRO, M. C. Tumores mamários na cadela e na gata. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 89, n. 509, p. 10 - 28, 1994.

PEREZ-ALENZA, M. D.; TABANERA, E.; PENA, L. Inflammatory mammary carcinoma in dogs: 33 cases (1995-1999). **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 219, n. 8, p. 1110 - 1114, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11700710/>. Acesso em: 22 mai. 2021. DOI: 10.2460/javma.2001.219.1110.

PICH, A.; MARGARIA, E.; CHIUSA, L. Proliferative activity is a significant prognostic factor in male breast carcinoma. **The American Journal of Pathology**. v. 145, n. 2, p. 481 - 489, 1994.

PICH, A.; CHIUSA, L.; MARGARIA, E. Prognostic relevance of AgNORs in tumor pathology. **Micron**. v. 31, n. 2, p. 133 - 141, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10588059/>. Acesso em: 19 mar. 2021. DOI: 10.1016/s0968-4328(99)00070-0

PLOTON, D. et al. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. **The Histochemical Journal**. v. 18, p. 05-14, 1986. DOI: 10.1007/BF01676192

QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos fatores de prognóstico. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 97, p. 119 - 127, 2002.

RAMOS, R. S. et al. Expressão gênica dos RE $\alpha$ , RE $\beta$ , e PR em tumores mamários de cadelas por meio do q-PCR. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 64, n. 6, p. 1471 -1477, 2012. DOI: 10.1590/S0102-09352012000600010.

RANGEL, M. M. et al. Eletroquimioterapia: Uma Nova Promessa para o Tratamento de Cânceres em Animais. **Clínica Veterinária**. v. 13, n. 75, p. 30 - 36, 2008. Disponível em: <<http://www.bv.fapesp.br/namidia/noticia/24857/eletroquimioterapia-nova-promessa-tratamentocancer/>>. Acesso em: 8 jun. 2021.

REESE, S. et al. Tegumento Comum: Glândula Mamária. In: KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H.G. **Anatomia dos Animais Domésticos**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. p. 639- 646.

RIVERO, E. R. C.; AGUIAR, M. C. F. Análise quantitativa das AgNORs no carcinoma adenóide cístico intra-oral através da técnica de dupla marcação PCNA/AgNOR. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 38, p. 39 - 44, 2002.

ROBBINS, M. Oncologia do Sistema Reprodutor. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2007. v. 2. p. 2437 - 2444.

SALAS, Y. et al. Epidemiological study of mammary tumors in female dogs diagnosed during the period 2002 - 2012: a growing animal health problem. **Plos One**. v. 10, n. 5, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25992997/>. Acesso em: 30 mar. 2021. DOI: 10.1371/journal.pone.0127381

SCHNEIDER, R.; DORN, C. R.; TAYLOR, D. Factors Influencing Canine Mammary Cancer Development and Postsurgical Survival. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 43, n. 6, p. 1249 - 1261, 1969. <https://doi.org/10.1093/jnci/43.6.1249>



SILVER, I. A. A anatomia da glândula mamária do cão e gato. **Journal of Small Animal Practice**. v. 7, p. 689 - 1296, 1966.

SFACTERIA, A. et al. Cyclin D1 expression in pre-cancerous and cancerous lesions of the canine mammary gland. **Journal of Comparative Pathology**. v. 128, n. 4, p. 245 - 251, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12834607/>. Acesso em: 02 fev. 2021. DOI: 10.1053/jcpa.2002.0622

SILVA, A. E.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G. D. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. **Ciência Rural**. v. 34, n. 2, p. 625 - 633, 2004. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/bScvYTTzVNjCDKMKszD9N3G/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 11 abr. 2021. DOI: 10.1590/S0103-84782004000200048.

SIMON, D. et al. Cytologic examination of fine-needle aspirates from mammary gland tumors in the dog: diagnostic accuracy with comparison to histopathology and association with postoperative outcome. **Veterinary Clinical Pathology**. v. 38, n. 4, p. 521 - 528, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19392751/>. Acesso em: 27 mai. 2021. DOI: 10.1111/j.1939-165X.2009.00150.x

SLEECKX, N. et al. Canine mammary tumours, an overview. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 46, n. 6, p. 1112 - 1131, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21645126/>. Acesso em: 09 jun. 2021. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2011.01816.x

SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v. 33, n. 3, p. 573 - 596, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12852237/>. Acesso em: 17 fev. 2021. DOI: 10.1016/s0195-5616(03)00020-2.

SORENMO, K. U. et al. Tumores da glândula mamária canina: um contínuo histológico de benigno a maligno: evidência clínica e histopatológica. **Oncologia Veterinária e Comparada**. v. 7, p. 162 - 172, 2009.

SORENMO, K. U. et al. Development, Anatomy, Histology, Lymphatic Drainage, Clinical Features, and Cell Differentiation Markers of Canine Mammary Gland Neoplasms. **Veterinary Pathology**. v. 48, n. 1, p. 85 - 97, 2011. Disponível em:

<https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/0300985810389480>. Acesso em: 17 mai. 2021  
DOI:10.1177/0300985810389480

SIVRIDIS, E; SIMS, B. Nucleolar organizer regions: new prognostic variable in breast carcinomas. **Journal Clinical Pathology**. v. 43, p. 390 - 392, 1990.

TATEISHI, M. et al. The close relationship between growth factors and the nucleolar organizer regions in adenocarcinoma of the lung. **European Journal of Surgical Oncology**. v. 21, n. 4 p. 398 - 402, 1995. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0748798395926151>. Acesso em: 01 mar. 2021. DOI: 10.1016/S0748-7983(95)92615-1.

TRAPP, S. M. et al. Causas de óbito e razões para eutanásia em uma população hospitalar de cães e gatos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 47, n. 5, p. 395 - 402, 2010. Disponível em: <http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/26821/28604>. Acesso em: 27 dez. 2020.

TRERÈ, D. AgNOR Staining and quantification. **Micron**. v. 31, n. 2, p. 127 - 131, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10588058/>. Acesso em: 07 jan. 2021. DOI: 10.1016/s0968-4328(99)00069-4.

VERSTEGEN, J. P.; ONCLIN, K. Prolactin and anti-prolactinic agents in the pathophysiology and treatment of mammary tumors in the dog. **North American Veterinary Conference**. v. 7, p. 7 - 11, 2006.

WERNER, P. R.; WERNER, J. Avaliação Histopatológica. In: DALECK, C.R.; DE NARDI, A.B.; RODASKI, S. **Oncologia em Cães e Gatos**. 1. ed. São Paulo: Rocca, 2009. cap. 6. p.121-134.

WERNER, P. R. Neoplasia. In: **Patologia Geral Veterinária Aplicada**. São Paulo: Roca, 2010. p. 189-232.

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. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 38, n. 1, 2001. Disponível

em: <http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/5917/7448>. Acesso em: 21 abr. 2021. DOI: 10.1590/S1413-95962001000100007.

ZUCCARI et al. Fatores prognósticos e preditivos nas neoplasias mamarias – importância dos marcadores imuno-histoquímicos nas espécies humana e canina – estudo comparativo. **Arquivo Ciência e Saúde**, v. 15, n. 4, p. 189 - 198, 2008.